

*Medicina
e
Chimica*

MEDICINA E CHIMICA

Monografie

dai Laboratori » *Bayer-Meister-Lucius* «
di ricerche medico-chimiche

„CO-FA”

Compagnia Farmaceutica S. A.

MILANO

1933

Col titolo «MEDICINA E CHIMICA» pubblichiamo per la prima volta una serie di lavori riassuntivi provenienti dai Laboratori » **Bayer-Meister-Lucius** « di ricerche medico-chimiche.

Con ciò corrispondiamo anche a un desiderio spesso manifestatoci, di far conoscere a una larga cerchia di Medici gli studi e i lavori che si fanno in tali Laboratori.

Il presente volume, di mole limitata, non può illustrare che una parte di questi studi; tuttavia esso dimostra in pari tempo che la scoperta di sostanze medicamentose è soltanto possibile mediante un lavoro di indagini rigorosamente scientifico, lavoro che risulta tanto più fruttifero quanto più stretta è la collaborazione tra i singoli laboratori medici e chimici.

I N D I C E

<i>H. Hörlein</i>	Medicina e Chimica	7
<i>C. L. Lautenschläger</i>	Ricerche sulle sostanze naturali per ot- tenerne rimedi efficaci	23
<i>L. Benda</i>	Preparati acridinici chemioterapici . . .	41
<i>W. Schulemann</i>	Costituzione chimica ed effetto dei me- dicamenti	49
<i>F. Laquer</i>	Metodi e scopi degli studi sulle vitamine	56
<i>R. Bieling</i>	Lo sviluppo della dottrina dell'immunità	69
<i>R. Schnitzer</i>	Lo sviluppo della chemioterapia delle infezioni batteriche	78
<i>W. Kikuth</i>	La immunità nelle malattie da protozoi	90
<i>H. Schmidt</i>	Giudizio comparativo degli elementi ad azione chemioterapica	101
<i>G. Domagk</i>	Acquisizioni recenti nel campo della tecnica istologica	114
<i>H. Schmidt</i>	I metodi attuali di lotta contro la dif- terite	125
<i>O. Schaumann</i>	Soprarenina e composti affini nella ane- stesia locale	145
<i>M. Bockmühl</i>	Antipiretici e analgesici della serie pi- razolonica	156
<i>H. Weese</i>	Gli sviluppi della sintesi degli ipnotici	175
<i>R. Rigler</i>	Fondamenti chimico-fisiologici della ipe- remia da lavoro	183
<i>F. Schönhöfer</i>	Studi sulla serie degli alcaloidi della china	191
<i>R. Fussgänger</i>	La standardizzazione dell'ormone ses- suale maschile	196
<i>O. Wagner</i>	Basi biologiche per la terapia speri- mentale delle verminosi	209

MEDICINA E CHIMICA

PROF. DR. PHIL. DR. MED. h. c. H. HÖRLEIN

Wuppertal-Elberfeld.

Quando un anno fa accettai di riferire alla riunione odierna sui moderni rapporti tra Medicina e Chimica, ho scelto a bella posta un titolo generale per avere la libertà di parlare sulle questioni di attualità.

Da gran tempo la Chimica, assieme alla Fisica e ad altre scienze naturali, è stata la base della Medicina, ma in nessuna altra epoca, se non erro, la Chimica ha così potentemente influenzato il pensiero e il lavoro medico come attualmente, mentre viceversa mai prima d'ora i problemi medici hanno tanto interessato i chimici quanto oggi. Basta ad es. gettare un sguardo al programma delle riunioni di quest'anno della Società tedesca di naturalisti e di medici per persuadersene. Un tema importante è quello della biologia e della chimica degli ormoni sessuali e i relatori su questo tema, i signori *Butenandt* e *Zondek* sono, fatto degno di nota, un chimico e un clinico ginecologo. In tutte le cliniche ostetriche tedesche ci si occupa di questioni di chimica, e credo di non dire troppo se affermo che con la dottrina degli ormoni la ginecologia ha avuto un impulso scientifico tutto nuovo, mentre ancora alcuni anni fa la parte clinica e la parte tecnica erano in primo piano.

D'altra parte i chimici cercano di penetrare nella mentalità medica più di quanto facessero in passato. In certe Università la fisiologia fa parte delle materie richieste per il dottorato in chimica e in certi Istituti Chimici Universitari vengono praticate ricerche farmacologiche e fisiologiche. Ovunque si creano nuove possibilità per la collaborazione tra medici e chimici. A Heidelberg fu creato l'*Istituto Kaiser Wilhelm* per le ricerche mediche, e in Inghilterra si è creata sotto la direzione del *Privy*

Conferenza tenuta alla riunione dei Medici e Naturalisti tedeschi a Wiesbaden il 28 settembre 1932.

Council for Medical Research una organizzazione che appoggia e favorisce tutti i rami della indagine medica, in particolare la collaborazione tra medici e chimici nelle Università, e, in speciali Istituti, lo studio dei problemi fisiologici, biochimici e chemioterapici.

Fortunatamente anche la Chimica tedesca è ben preparata ad affrontare i problemi medici. Lo studio di prodotti greggi e del ricambio che abbiano importanza fisiologica è sempre stato seguito con interesse dai nostri migliori chimici organici.

Per ricordare soltanto alcuni nomi, cito: i lavori di *Emil Fischer* sugli zuccheri e gli albuminoidi, di *Willstätter* sui fermenti, di *Wieland* sugli acidi biliari, di *Windaus* sulle sterine e di *Hans Fischer* sulla sostanza colorante del sangue e della bile. Molti di loro conosceranno la magnifica relazione di *Hans Fischer* sulla emina, la bilirubina e la porfirina, e la relazione di *Borst* sulla morfologia della porfirina all'ultimo Congresso di Königsberg.

Questo elenco è naturalmente incompleto. È praticamente impossibile ricordare in una breve relazione tutti i campi che attualmente interessano in pari misura medici e chimici, sia perchè le ricerche relative, ad es. sugli enzimi cristallini o sulla glicolisi e la respirazione, non hanno ancora portato a conseguenze pratiche, sia perchè gli studi sulla contrazione muscolare e sulle sostanze proprie dell'organismo ad azione sul circolo hanno già superato il periodo preparatorio e messo in mano al medico internista nuove armi curative.

Mentre in passato la chimica farmaceutica classica costituiva il collegamento principale tra medicina e chimica, nel corso del tempo la chimica fisiologica e la chemioterapia si affermarono come campi a sè di indagini e di dottrine. I rapporti tra medico e chimico furono e sono in queste tre discipline affatto differenti. La chimica farmacologica ha le sue radici nella elaborazione chimica di sostanze medicamentose naturali, cui seguì più tardi la preparazione di rimedi sintetici, di cui la farmacologia, scienza che determina qualitativamente e quantitativamente il valore dei rimedi naturali e artificiali, costituisce il

ponte di passaggio tra la chimica e la medicina. Giudice in ultima istanza rimane e rimarrà la medicina clinica.

Molto più stretti sono i rapporti tra medico e chimico nella chemioterapia. La cernita dei test necessari al saggio in serie delle sostanze chimiche da un lato, la preparazione di queste sostanze e le loro varianti secondo i risultati delle ricerche sperimentali e successive prove chimiche d'altro lato, comportano di necessità una stretta collaborazione tra medici e chimici. In base alla nostra personale esperienza fatta nella ricerca di nuovi rimedi per malattie tropicali io credo di poter dire che il chemioterapista più suscettibile di successi nel ritrovamento di nuovi rimedi specifici sarà quel medico che avrà a sua disposizione i chimici più abili, e che le migliori probabilità di successo nella sintesi di sostanze medicamentose avranno quei chimici che abbiano la fortuna d'avere a collaboratori dei medici nella ricerca e nella elaborazione di nuovi test.

Ehrlich, il fondatore della chemioterapia, era non soltanto un medico di prim'ordine; egli aveva anche profonde cognizioni chimiche e aveva saputo assicurare al suo Laboratorio la collaborazione di abili chimici. Nei paesi anglosassoni è stata recentemente introdotta per una tale collaborazione bene organizzata nello studio di grandi problemi, la cui soluzione va oltre le forze di un singolo studioso e oltre i confini di una sola scienza, la denominazione di « team work », mentre l'organizzatore di cotesto lavoro in comune, nelle cui mani stanno i fili direttivi, è chiamato il « leader of the team ». Queste espressioni sono proprie della terminologia sportiva, ma in America e in Inghilterra sono attualmente di uso comune anche negli ambienti scientifici, e specialmente per la collaborazione negli studi che sono al confine della biologia.

Molto vari sono i rapporti tra medici e chimici nella chimica fisiologica e nella fisiologia chimica. Secondo il problema che è in istudio, primeggia talvolta la clinica, talvolta la medicina sperimentale, talvolta la chimica. Di valore decisivo per le

direttive moderne in questo campo di indagini è il fatto, che le sostanze formate nell'organismo animale e vegetale hanno, oltre a una importanza statica, una importanza dinamica, che in casi particolari queste sostanze esercitano anche effetti farmacologici e con ciò diventano rimedi. Alludo soprattutto agli ormoni e alle vitamine. È la clinica che per lo più presenta i problemi in questo campo. *Addison* e *Minkowski* erano clinici. Invece la scoperta del test è di regola frutto degli studi sperimentali; così è avvenuto ad es. per opera di *Banting* e *Best* per l'insulina, di *Allen* per l'ormone della fregola. La preparazione allo stato di purezza delle sostanze attive ottenute dagli animali fu fatta da chimici fisiologici o da chimici puri; da *Fürth* per la adrenalina, da *Kendall* per la tirossina, da *Doisy* e *Butenandt* per gli ormoni sessuali. La sintesi infine è naturalmente di stretta spettanza dei chimici; *Stolz* ha preparato l'adrenalina, *Harington* la tirossina. Abbastanza spesso la preparazione chimica di una sostanza allo stato di purezza dà origine a nuovi problemi medici; mi basti ricordare le migliaia di pubblicazioni che fecero seguito alla scoperta dell'insulina e della tirossina.

Oltre agli ormoni in senso stretto si formano nell'organismo altre sostanze farmacologicamente attive, la cui scoperta dobbiamo del pari al lavoro comune di medici e chimici. La epatoterapia perorale fu introdotta in comune dai medici di Boston *Minot* e *Murphy* e dal chimico e fisiologo *Edwin Cohn. Gänsslen*, che per primo ottenne preparati di fegato iniettabili, è del pari un clinico. Al chimico puro manca in questo campo la possibilità di fare da solo, perchè non esiste ancora alcun test, in base al quale si possa con grandi ricerche in serie stabilire in quale frazione è presente il principio attivo. È questo un campo di proficuo lavoro per la medicina sperimentale.

Sull'ormone circolatorio del pancreas lavorarono il medico *Frey* e il chimico *Kraut*, e così si poterono rapidamente approfondire le nostre nozioni sulla chimica e sugli effetti di questa sostanza. Anche i nucleosidi, ritenuti finora soltanto come pietre

fondamentali chimiche dell'organismo, hanno acquistato interesse terapeutico per la collaborazione di medici e chimici. Qui la chimica fisiologica è divenuta, quando al posto dei metodi fisiologici si posero le ricerche farmacologiche, farmacologia e da ultimo terapia.

Uno sviluppo simile a quello degli ormoni hanno avuto le Vitamine. La Vitamina prodotta per prima è la Vitamina anti-neuritica oggi denominata B₁, ottenuta dalla crusca di riso o dal lievito. Nel 1897 il medico *Eijkmann*, che era addetto a un ospedale giavanese di detenuti, osservò nei polli del suo lazaretto una malattia, che aveva una notevole rassomiglianza col beri-beri dei suoi pazienti. Constatò inoltre che i polli si erano ammalati soltanto perchè da alcune settimane erano nutriti coi rifiuti della cucina, ossia con riso mondato e bollito, anzichè, come in passato, con riso crudo, non privato della sua cuticola; inoltre che ripristinando l'alimentazione antecedente i sintomi polineuritici scomparivano. Infine egli constatò che nella crusca del riso è contenuta quella sostanza, che, aggiunta al riso brillato evita nei polli la comparsa delle paralisi, ed anzi fa guarire la malattia già scoppiata.

Eijkmann aveva dunque trovato un modo classico per provocare il beri-beri sperimentale e per valutare singoli alimenti rispetto a questa malattia. Tuttavia non venne nel concetto di una mancanza di elementi alimentari ignoti. Pensò piuttosto ad una mancanza di sali minerali nell'alimentazione. Il fenomeno da lui scoperto fu soltanto più tardi esattamente interpretato da altri, dopo che colle esperienze di alimentazione di *Stepp* con alimenti privi di lipoidi, nonchè per le ricerche di *Hopkins* con miscele alimentari composte di alimenti purissimi, divenne di nozione generale, che oltre alle note sostanze alimentari principali e ai sali, ci sono altre sostanze ignote, assolutamente necessarie per lo sviluppo e la prosperità dell'organismo animale, che furono chiamate da *Hopkins* « accessory food factors ».

Poco dopo che furono note le ricerche di *Stepp* e *Hopkins*,

il chimico *Casimiro Funk* comunicò d'avere ottenuto dalla crusca di riso una sostanza ad azione intensa sul beri-beri sperimentale dei colombi, sostanza di natura basica, per la quale egli scelse la denominazione di *Vitamina*, ossia amina vitale. Questa denominazione divenne poi una denominazione di gruppo e si mantenne, quantunque si sappia ormai da lungo tempo che proprio le Vitamine meglio studiate non appartengono alla classe delle amine, ma a gruppi chimici del tutto diversi.

La scoperta di *Funk* fece volgere l'interesse dei chimici di tutto il mondo verso questo microcomponente di importanza vitale. Dello studio della sostanza presente nella crusca di riso si occuparono specialmente studiosi giapponesi e olandesi. A poco a poco il prodotto fu ottenuto in istato di purezza sempre maggiore. Tuttavia dopo l'osservazione di *Funk* dovettero passare circa 20 anni perchè la Vitamina antineuritica fosse ottenuta, nell'autunno scorso, in forma pura dal lievito, mercè la collaborazione del Laboratorio di Chimica della Università di Gottinga e del nostro Laboratorio fisiologico di Elberfeld, e fosse riconosciuto che essa è un'amina contenente zolfo.

Con ciò era fatto il primo passo per sceverare il complesso vitaminico dei fermenti. Si riescì ben presto a preparare in forma pura la Vitamina B₂, efficace contro la pellagra, e tutte le altre vitamine dei fermenti, nonchè il bios, del pari presente in questo interessante materiale greggio e responsabile della suddivisione cellulare; ciò dopo che *Went* e *Kögl* di Utrecht ebbero riferito nella Sezione di Chimica di questa assemblea sulla importanza e la chimica della sostanza che agisce sullo sviluppo delle piante.

Lo stesso sviluppo che ebbe la Vitamina antineuritica ebbero anche le altre Vitamine. Clinici, medici sperimentatori e chimici di tutte le nazioni civili lavorarono alla soluzione di questi problemi. Per la Vitamina A stanno attualmente in primo piano le ricerche chimiche, dopo che con studi sperimentali è stato accertato che con la carotina, largamente diffusa in natura e ottenibile in stato cristallizzato in modo relativamente facile, si

ottiene un effetto del genere di quello della Vitamina A. Soprattutto ai chimici *von Euler, Karres e Kuhn* dobbiamo i rapidi progressi delle nostre cognizioni in questo campo.

Riguardo alla Vitamina C antiscorbutica, che nell'anno scorso fu considerata come un derivato della narcotina, delle ricerche critiche successive, quali furono ad es. recentemente pubblicate da *Dalmer e Moll* del Laboratorio scientifico della Ditta Merck di Darmstadt, dimostrarono come sia importante di unire alle indagini chimiche le esatte ricerche sugli animali, quando si voglia salvaguardarsi da conclusioni troppo affrettate. La questione della natura chimica della Vitamina C deve essere considerata come tuttora insoluta.

Riguardo alla rachitide, dobbiamo pure a un medico, l'inglese *Mellanby*, la nozione che si tratta di una malattia da carenza. È merito di fisiologi americani, in particolare di *Mc. Collum* di Baltimora, di avere fatto conoscere come oggetto di test la rachitide dei ratti. Il valore terapeutico dei raggi ultravioletti nella cura della rachitide infantile fu riconosciuto dal medico berlinese *Huldschinsky*; la possibilità di comunicare proprietà antirachitiche ai cibi, press'a poco alla stessa epoca dal pediatra di Nuova - York *Hess* e dal chimico - fisiologico *Steenbock* di Madison. Ben presto si riconobbe che sono le sterine, componenti non saponificabili dei grassi e degli oli, che possono essere attivate dalla luce ultravioletta, e allora sorse una nobile gara tra chimici di ogni nazione per scoprire la provitamina relativa e farne mediante la irradiazione ultravioletta un fattore antirachitico. Da anni è nota come provitamina la ergosterina.

È merito dei chimici del *National Institute for medical Research* di Londra e soprattutto di *Windaus* e della sua scuola l'essere riusciti a frazionare la miscela che si ottiene dalla ergosterina con l'irradiazione ultravioletta, e di avere ottenuto in forma pura la sostanza attiva antirachitica che è contenuta in questa miscela; fu anzi uno scolaro di *Windaus*, il *Lintert*, il quale è addetto al nostro Laboratorio biochimico, che riuscì in

stretta collaborazione col suo antico maestro ad ottenere per primo in forma pura cristallizzata la sostanza attiva antirachitica, il che riuscì poco dopo con altri mezzi a studiosi di Londra. Tuttavia in questa serie di ricerche manca ancora l'anello ultimo, ossia il confronto diretto tra questa Vitamina ottenuta sinteticamente e la sostanza attiva antirachitica isolata dall'olio di fegato di merluzzo. Finchè questo confronto dimostrativo manchi, il quesito se la vitamina ottenuta sinteticamente sia assolutamente identica o no al fattore antirachitico dell'olio di fegato di merluzzo, resta aperto. Tuttavia mediante la preparazione della Vitamina D sintetica cristallizzata è risolto per i pediatri il problema dell'esatto dosaggio nella rachitide.

Ma come dopo ogni soluzione di un problema parziale, sorge subito un gran numero di problemi nuovi, così anche qui si deve chiedersi: Quale è la ragione, per la quale una sostanza isomera dell'ergosterina, modificata strutturalmente dalla energia luminosa, contrariamente a quanto avviene per il materiale di origine e per i prodotti intermedi di questa trasformazione (la lumisterina e la tachisterina), esercita nella rachitide un effetto così enorme? Dove si svolge questo effetto, quale ne è il meccanismo?

Sorge così buon numero di problemi che interessano in pari misura medici e chimici. Per non uscire dai limiti di una rapida rassegna mi sono attenuto a una esposizione schematica in brevi tratti. Lo stato effettivo di queste questioni è naturalmente molto più complicato. In molte occasioni le direttive di lavoro da me accennate si incrociano; la vecchia chimica farmaceutica sintetica sta a fianco della più moderna ricerca dei farmaci che sono formati nell'organismo stesso; da questa ultima essa può essere indirizzata a nuovi gruppi di sostanze. Così ad es. la determinazione della costituzione della adrenalina portò a sintesi nel gruppo adrenalino, nell'intento di scoprire nuove sostanze ad azione sui vasi. Questa direttiva di lavoro promette un largo campo di studio per il futuro. La chimica può anche qui cercare di alzare un velo sui segreti della natura per poi superarli

con un lavoro particolare. Forse degli ormoni e delle vitamine sinteticamente ottenuti saranno superiori ai loro predecessori naturali, parimenti a quanto vediamo oggi con i colori fissi Indanthren rispetto alle sostanze coloranti fornite dalla natura, l'indaco e la porpora degli antichi.

Le parole di introduzione pronunciate dal signor Presidente e la prima Relazione della Seduta odierna furono dedicate a *Roberto Koch*, il maestro negli studi sulle malattie infettive. Mi sia permesso, nella seconda parte della mia Relazione, di occuparmi un po' estesamente, sempre in base alla mia esperienza personale, degli studi fatti in comune da medici e chimici per la lotta contro le malattie infettive. Un lavoro illimitato c'è ancora da fare, a mio avviso, in questo campo. Esiste bensì accanto a vaccini e sieri, ad es. il siero antidifterico e l'antitossina tetanica, la cui preparazione chimica attende già da decenni la soluzione ed è sperabile la si trovi dati i continui perfezionamenti dei metodi chimici, un gran numero di rimedi sintetici, specialmente nel campo delle malattie da protozoi; ma il campo delle malattie batteriche e di quelle provocate da virus ultravisibili, è ancora assolutamente aperto al lavoro comune di medici e di chimici. Cercherò con due esempi concreti di dimostrare come anche nel campo delle malattie infettive sia possibile, mediante un tale lavoro comune, di portare sempre più sotto il dominio della medicina pratica anche queste calamità. Intendo parlare dei rimedi attualmente più efficaci contro il kala-azar e contro la malaria.

Il kala-azar è una malattia a diffusione epidemica, soprattutto in India e in Cina, che si svolge in modo acuto oppure cronico; è caratterizzata da tumefazione della milza e del fegato, da emorragie della pelle e delle mucose, da fenomeni gangrenosi e dissenteria, è accompagnata da una grave anemia ed ha in quasi tutti i casi esito letale. *Napier* ha calcolato che il numero dei colpiti nella sola Calcutta e nella provincia indiana del Bengala era nel 1923 di un milione. Nella provincia di Assam il numero

non sarebbe stato molto minore. Quale sia la mortalità in Cina non si può valutare neppure approssimativamente.

La malattia è provocata da un protozoo che fu scoperto nel 1903 quasi contemporaneamente da *Leishman* e *Donovan* e che è stato chiamato *Leishmania Donovan*.

Fino al 1915 si fu del tutto impotenti di fronte a questa malattia, che oltre che in India e in Cina viene osservata anche sulle sponde del Mediterraneo e quivi soprattutto in bambini; e si doveva accontentarsi di una cura puramente sintomatica, che forse dava sollievo ai malati ma che non evitava la morte in quasi il 98 % dei casi. Con la introduzione, fatta appunto nello stesso anno da *Rogers* in India, della terapia antimoniale in forma di tartaro stibiato, la situazione cambiò radicalmente.

L'uso dell'antimonio come rimedio risale ai tempi più remoti della storia culturale dell'umanità. La introduzione di esso nella terapia moderna, specialmente nella chemioterapia, la dobbiamo a un'osservazione di *Plimmer* e *Thomson* (1907), che iniettando tartaro stibiato a ratti infettati di tripanosomi liberarono, almeno per un certo tempo, gli animali dai parassiti. Poco dopo fu scoperto il potere curativo del tartaro stibiato nella malattia del sonno dell'uomo e nelle più varie tripanosomiasi degli animali (*Broden, Manson, Hornby*). Nel 1913 *Vianna* constatò nel Brasile che la leishmaniosi cutanea ivi diffusa, il cui germe è affine a quello del kala-azar, è influenzabile col tartaro stibiato. Nel 1915 *Di Cristina* e *Caronia* di Napoli riferirono di guarigioni ottenute nella leishamiosi infantile e nello stesso anno questa terapia fu usata, come già si disse, da *Rogers* nel territorio epidemico principale delle Indie britanniche.

Benchè i risultati fossero in molti casi buoni, la mortalità dei casi curati oscillò ancora tra 15 e 25 %. Si aggiunga che una tale cura richiedeva 2-3 mesi di tempo e che il tartaro stibiato da molti pazienti era mal tollerato e anche nei soggetti guariti dava luogo a gravi disturbi. Centinaia di migliaia di uomini poterono bensì essere salvati col tartaro stibiato, ma de-

cine di migliaia morirono ad onta di esso o furono vittime del rimedio stesso dato ad alte dosi.

Era pertanto ben giustificato il desiderio di andare alla ricerca, col sussidio della Chimica sintetica, di composti di antimonio che avessero la virtù curativa del tartaro stibiato senza gli effetti accessori tossici e sgradevoli dello stesso. Questo compito fu assunto da *Uhlenhuth* e suoi collaboratori medici, nonché dal chimico *Hans Schmidt*. Nel corso degli anni furono ottenute da *Schmidt* molte centinaia di composti di antimonio, specialmente della serie aromatica, che *Uhlenhuth* e *Kuhn* sperimentarono rispetto alla loro efficacia terapeutica nella infezione tripanosomica dei ratti con ricerche protratte per molti anni. Allora non si conosceva ancora un metodo per sperimentare i preparati sui germi stessi del kala-azar.

Prendendo come punto di partenza l'acido p-amminofenilstibinico ottenuto per diazosintesi, risultò in un primo tempo utilizzabile il sale sodico di questo acido, la Stibamin. Mediante sostituzione nel gruppo amminico si ottennero preparati anche migliori. Particolarmente efficace si dimostrò nelle ricerche chemioterapiche lo Stibenil (p-acetilamminofenilstibiato di sodio) che nel 1915 fu usato con buon successo da *Caronia* in Italia per la cura della leishmaniosi infantile, richiese una cura molto più breve del tartaro stibiato e fu di questo meglio tollerato.

Un ulteriore progresso fu ottenuto con lo Stibosan che presenta una sostituzione nel nucleo benzolico ed è costituito da p-acetil-m-clorofenilstibiato di sodio. Il preparato saggiato nei topi infettati di tripanosomiasi e trovato efficace, fu usato con successo da *Napier* nell'Istituto per malattie tropicali di Calcutta nel kala-azar degli adulti, mentre l'indiano *Brahmachari* ha raccomandato l'ureastibamin, ottenuta facendo agire l'urea sull'acido p-amminofenilstibinico.

Esperienze fatte per anni in India avevano tuttavia dimostrato che tutti i composti fin qui ricordati potevano essere ulteriormente migliorati. L'ultimo e più proficuo passo nella preparazione di un rimedio optimum contro il kala-azar fu fatto

nel corso degli ultimi anni mediante la collaborazione di *Napier* a Calcutta e dei nostri Laboratori di Elberfeld.

Con ricerche sistematiche nel campo della chimica dei colloidi *Hans Schmidt* riescì, partendo dal p-amminofenil-stibiato di dietilammina, a ottenere una serie di derivati con tossicità assai ridotta, e tra essi quel preparato che ebbe in seguito il nome di Neostibosan, e che secondo le ricerche farmacologiche di *Eichholtz* si dimostrò particolarmente atossico. Aveva un solo difetto e cioè che nel test allora noto, il nagana del topo, non esplicava alcun effetto. Fortunatamente *Roehl* scoprì allora nel nostro Laboratorio chemioterapico che l'Hamster (*Cricetus frumentarius*), che già *Meleney* e *Young*, nonchè *Martin Mayer* avevano riferito essere infettabile di kala-azar, si prestava come test per la valutazione di preparati sintetici. Risultò che l'indice terapeutico del nuovo preparato è di 1:50, in raffronto a 1:5 - 1:7 dello Stibosan.

Le esperienze cliniche confermarono le aspettative che si potevano avere in base alle ricerche di Laboratorio. *Napier* trovò che il preparato era assai attivo nel kala-azar, senza presentare in pari tempo effetti accessori spiacevoli. Da ricerche proseguite per anni risultò che anche i casi più gravi di kala-azar possono essere portati a guarigione nella proporzione di fino al 98 % con 8-10 iniezioni intravenose o intramuscolari di Neostibosan. A parte la sicurezza di azione, si ha col Neostibosan il vantaggio di abbreviare la cura. Mentre una cura di tartaro stibiato dura in media 2-3 mesi, per una cura di Neostibosan occorrono 8-10 giorni. Il problema della guarigione chemioterapica del kala-azar, che lasciato a sè ha quasi sempre esito letale, ha dunque trovato per merito della chimica sintetica una soluzione ideale.

Progressi terapeutici simili a quelli ottenuti nel kala-azar si ottennero anche nella malaria. Sei anni fa io riferii alla Riunione dei naturalisti a Düsseldorf sulle basi chimiche e la storia della preparazione della Plasmochina. Per non ripetermi rimando a questa Relazione e mi limito a ribadire brevemente le diffe-

renze di effetti tra chinina e Plasmochina. Mentre la chinina è efficace contro tutte e tre le forme dei parassiti malarici, ma non ha pressochè alcuna azione sulle forme sessuate (gameti) della malaria estivo-autunnale, la Plasmochina è per lo meno altrettanto attiva della chinina nella malaria terzana e quartana, ma è ad essa inferiore per effetto verso le forme asessuate della malaria estivo-autunnale, i così detti schizonti. D'altra parte la Plasmochina ha la proprietà, che alla chinina manca, di distruggere ad alte dosi le semilune, e a dosi basse di inibire l'ulteriore sviluppo di esse nella zanzara. In ciò sta appunto la massima importanza della Plasmochina, perchè soltanto con essa fu possibile di interrompere radicalmente il ciclo di sviluppo «uomo - zanzara - uomo», e con ciò di tentare per via medicamentosa con speranza di successo il risanamento di plaghe malariche. La Plasmochina divenne il rimedio di scelta, per rendere non pericolosi, per il rimanente della popolazione, dei pazienti infetti di malaria tropicale; ciò perchè appunto dai gameti non influenzabili con la chinina gli anofeli vengono infettati, e alla loro volta ridiventano dopo 8-14 giorni infettanti per gli uomini.

Il preparato viene soprattutto usato in associazione con la chinina, mediante la quale la percentuale di recidive della malaria terzana grave scende dalla media del 50% al 3-5%. Inoltre la Plasmochina ha, secondo le esatte ricerche di *James*, una certa azione profilattica causale verso gli sporozoiti che giungono nell'organismo umano con la puntura delle zanzare, mentre con la chinina è, secondo *Warrington Yorke* e *Macfie*, soltanto possibile una profilassi sintomatica. Questa profilassi chininica sintomatica, tanto decantata, deve essere considerata, secondo questi nuovi studi, come una cura spesso insufficiente della malaria, che doma bensì gli accessi acuti di malaria, ma non uccide con sicurezza i plasmodi, sicchè quando la somministrazione profilattica di chinina cessa, gli accessi febbrili si possono ripetere.

Da quanto sopra risulta che con la Plasmochina si è trovato un secondo antimalarico che agisce in modo nuovo, ma

che d'altra parte la chinina non può essere completamente sostituita dalla Plasmochina, sicchè il problema di trovare una chinina perfezionata permane come prima. A questo compito si è rivolta in questi ultimi anni una gran parte degli studi dei nostri Laboratori di ricerca.

Per riuscire nello scopo prefissoci si dovettero elaborare ulteriormente i test, perchè la differenza tra chinina e Plasmochina rispetto al valore curativo, differenza che risultò soprattutto nella malaria estivo-autunnale, non potè essere riconosciuta col metodo di *Roehl*, della malaria degli uccelli. Esisteva soltanto una differenza quantitativa, ma non essenziale.

Dopo la morte del nostro *Roehl*, troppo presto rapitoci, le esperienze chemioterapiche furono proseguite dal suo successore *Kikuth*. Egli cominciò le sue ricerche con diversi stipiti di malaria degli uccelli che si differenziano nei rapporti morfologici, clinici e immuno-biologici. La speranza di dimostrare una differenza essenziale in questi stipiti non si avverò.

Soltanto quando si usò per test la infezione da emoproteo del fringuello africano di risaia (*Orizonis orizivora*) si riescì a fare un progresso notevole e a stabilire una differenza essenziale tra i due preparati standard: chinina e Plasmochina.

Mentre la Plasmochina agisce nella malaria degli uccelli in senso essenzialmente uguale alla chinina, nella infezione da emoproteo dei fringuelli si constata che i gameti visibili nel sangue periferico vengono bensì uccisi dalla Plasmochina, ma non dalla chinina; che per contro anche con la Plasmochina non si possono evitare recidive, bensì si possono soltanto evitare con una associazione di Plasmochina e chinina. *Kikuth* ne dedusse che la chinina, la quale non ha effetti constatabili sulla infezione da emoproteo per se stessa, danneggia soltanto gli schizonti presenti nelle cellule endoteliali degli organi interni, schizonti dai quali come è noto si sviluppano i gameti. Valendosi di questo nuovo test si riescì anche ben presto a trovare dei preparati sintetici che nel loro modo di azione assomigliavano più alla chinina che

alla Plasmochina. Tra questi preparati si impose un prodotto della serie acridinica, che era stato preparato da *Mauss* e *Mietzsch* nel nostro Laboratorio chimico, diretto da *Schulemann*.

L'opinione espressa da *Kikuth* in base alle sue ricerche sperimentali, che il nuovo prodotto dovesse essere nella malaria estivo-autunnale soprattutto uno schizonticida, ha trovato piena conferma. Dapprima l'efficacia del preparato fu constatata da *Sioli* nella malaria da inoculazione dei paralitici. Le prime guarigioni di malaria estivo-autunnale furono ottenute da *Peter* in Romania; durante l'anno testè decorso il preparato fu usato su basi più larghe da *Mühlens* e collaboratori nell'Istituto per le malattie tropicali di Amburgo, nonché in diverse regioni tropicali e subtropicali di tutto il mondo, sicchè oggi sommano a molte migliaia i casi curati. Per ora non si possono naturalmente trarre deduzioni definitive e bisogna attendere esperienze ulteriori, ma già oggi si può dire quanto segue di questo preparato, introdotto recentemente in terapia col nome di Atebrin.

La durata della cura con l'Atebrin è in media di 5-7 giorni, in contrapposto a una cura chininica che dura 2-3 settimane. La dose complessiva necessaria di Atebrin è di gr. 1,5-2, quella di chinina di gr. 20-30. La percentuale delle recidive che con la cura chininica è, specialmente nella malaria terzana, assai alta, in media del 50 %, con la cura di Atebrin scende a una cifra minima. Il preparato può essere dato senza pericolo nella febbre emoglobinurica e nei casi di idiosincrasia alla chinina, ed è quindi stato accolto con grande favore specialmente nelle complicazioni. La tolleranza è buona; mancano in particolare effetti accessori, che con la chinina, specialmente se usata a lungo, danno molto fastidio ai pazienti. Si deve peraltro considerare come risultato antiestetico, specialmente nelle persone anemiche, la leggera colorazione gialliccia della pelle, che non dipende però da offesa del fegato, bensì dal colore stesso del preparato e che scompare completamente dopo due settimane.

La Plasmochina è il primo gameticida sintetico, l'Atebrin

lo schizonticida sintetico cercato. Manca ancor oggi un rimedio causale per la profilassi antimalarica. La Plasmochina ha, come già si è ricordato, una certa azione profilattica causale, ma per questa indicazione è troppo tossica trattandosi di una somministrazione prolungata. Riguardo all'Atebrin nulla si può ancora dire di sicuro. Se profilatticamente dovesse fallire, si può sperare che col comune lavoro di medici e chimici si riuscirà ben presto a colmare questa lacuna.

Nella mia Relazione ho parlato molto di test fisiologici e chemioterapici, e ciò per una ragione determinata. Volevo dimostrare che valendosi di questi test di confronto, anche se a priori appaiono poco soddisfacenti, si possono scoprire rimedi efficaci. La rachitide dei ratti si distingue per dati importanti, soprattutto morfologici, dalla rachitide infantile, e tuttavia essa fu la guida che permise alla fine di ottenere la vitamina antirachitica cristallizzata. Le ricerche sul nagana dei topi e più tardi sul kala-azar del cricetus, permisero di trovare un rimedio contro il kala-azar dell'uomo, col quale il concetto fondamentale di *Ehrlich* della terapia sterilizzante completa poté essere messo in pratica in modo pressochè totale. Con lo studio delle infezioni dei canarini e dei fringuelli di risaia furono ottenuti i due nuovi antimalarici Plasmochina e Atebrin. Anche per la malattia cui è volta più che a tutte la nostra attenzione, per il cancro, non abbiamo alcun test assolutamente paragonabile ai tumori umani. Già più volte ho udito clinici esprimersi in modo scettico riguardo alle esperienze sui tumori degli animali. Se le mie considerazioni, le quali tendono a dimostrare che anche con test apparentemente manchevoli si può giungere da ultimo ad ottenere preparati efficaci, potessero indurre un certo ottimismo anche nel campo dei tumori, questo sarebbe il migliore successo che la mia Conferenza potesse sperare. Chiudo esprimendo il voto che in avvenire Medicina sperimentale e clinica procedano di pari passo con la scienza e la tecnica chimica nello studio dei molti problemi che ancora sono da risolvere.

Ricerche sulle sostanze naturali per ottenerne rimedi efficaci.

PROF. DR. ING. DR. MED. C. L. LAUTENSCHLÄGER

Francoforte s. M. - Hoechst

Fino verso il 1880 i nostri medicamenti consistevano quasi esclusivamente in sostanze naturali; quelli di natura minerale erano in forma di sali diversi, i medicamenti organici erano soprattutto droghe ed estratti più o meno depurati di materiale vegetale o animale. Col perfezionarsi delle sintesi organiche cominciò a svilupparsi progressivamente anche la preparazione artificiale di vari medicamenti, preparazione la quale ebbe notoriamente inizio con la sintesi del sulfonale per opera di *Baumann*, della cairina, di *O. Fischer*, dell' antipirina, di *Knorr*, della fenacetina, di *Duisberg* e *Hinsberg*. Da queste sostanze fondamentali terapeuticamente importanti si sviluppò progressivamente la sintesi ulteriore di rimedi attivi e con varie indicazioni. Dal 1890 fino all'inizio della guerra l'interesse per la sintesi dei medicamenti si mantenne in primo piano e si ebbe l'impressione che la elaborazione di sostanze naturali per ottenerne rimedi fosse rimasta un po' alla retroguardia. Ma in questi due ultimi decenni si è potuto osservare in tutta la chimica organica un evidente cambiamento di rotta. Accanto alla sintesi riprese ad affermarsi la indagine biochimica e questo cambiamento risultò con particolare evidenza anche negli studi sui medicamenti. «Tornare alla natura» è la parola d'ordine di questi due ultimi decenni, perchè abbiamo appreso che vegetali e animali ci danno tuttora molte preziose sostanze medicamentose che la mano dell'uomo non può ancora preparare artificialmente.

Ma mentre in passato ci si accontentava di somministrare le sostanze naturali in forma più o meno depurata, attualmente la esatta indagine biochimica e fisiologica ha sostituito la semplice preparazione di estratti. Attualmente quanto ci interessa

al massimo grado è la preparazione allo stato di purezza d'una data sostanza, la constatazione della sua composizione molecolare, il quesito della sua genesi e del compito che deve svolgere in un vegetale o in un animale determinato, quello della sua azione fisiologica.

Vogliamo strappare alla natura il segreto delle sue sintesi semplici e razionali, intendere come essa ottiene le sostanze otticamente attive, che hanno spesso una grande importanza per l'effetto fisiologico. Queste le grandi linee dello stato attuale degli studi sulle sostanze naturali; studi che si compiono con ritmo sempre più accelerato, tanto che non è quasi più possibile di seguire con diligenza pari alla importanza del compito tutti quei campi di studio che sono importanti per le ricerche sui medicamenti.

Nel rapido sviluppo di queste direttive di indagini ha gran parte il perfezionamento dei metodi di lavoro fisici, microchimici e fisiologici. Ricordo le ricerche spettrografiche sui reticoli dei cristalli le quali hanno straordinariamente facilitato lo studio sistematico delle sostanze a molecola elevata, inoltre le determinazioni di spettri caratteristici di assorbimento nel campo ultravioletto, che risultarono necessarie per identificare e separare sostanze altamente attive, ad es. la Vitamina D; poi l'ultramicroscopio che molti importanti elementi ha portato allo studio della chimica dei colloidi. Le più interessanti determinazioni della costituzione, fatte nel campo degli alcaloidi, delle sostanze coloranti del sangue, della bile e dei vegetali, e nel campo delle sterine (*Willstätter, Wieland, Windaus, Fischer, Karrer* e altri), furono possibili soltanto dopo che furono trovati dei metodi per analizzare chimicamente e fisicamente quantità piccole e piccolissime di sostanza. Del pari fu possibile di vedere più addentro nel ricambio cellulare soltanto dopo che furono elaborati esatti metodi di misurazione microchimica; ad es. la constatazione di quantità piccolissime di ammoniaca, di acido fosforico o di glicosidi purinici, quali *Emden, Meyerhof* e altri hanno usata per i loro studi sulla fisiologia dell'attività muscolare. Ricordo inol-

tre le esatte misurazioni cinetiche che sono state elaborate da *Willstätter* e scolari, per poter seguire gli effetti degli enzimi sul substrato. E' inoltre interessante di ricordare come con l'elaborazione dei metodi biologici di standardizzazione abbiano avuto un forte impulso gli studi biochimici sui medicamenti.

I primi metodi farmacologici di ricerca ancora relativamente grossolani, applicati da *Schmiedeberg* e dalla sua scuola, sono stati perfezionati in molte parti ai giorni nostri. Dopo la semplice registrazione cruenta della pressione sanguigna e della respirazione spontanea in seguito ad applicazione di veleni, seguirono progressivamente i metodi per il saggio di sostanze su organi sopravvivalenti isolati, indi le misurazioni su segmenti circoscritti dell'animale stesso, tra le quali i metodi più moderni sono quelli del preparato cardio-polmonare di *Starling* e l'orologio a corrente di *Rein*.

Inoltre furono elaborati: i metodi di misurazione fisiologici e cinematografici su complessi cellulari sopravvivalenti, quali furono ad es. usati da *Warburg* per le sue ricerche sulla respirazione, da *Carell* per le sue ricerche sui tessuti, e da *Canti* per i suoi studi sul cancro; infine le colorazioni vitali elettive e la parziale eliminazione di centri di importanza vitale col metodo di *Magnus* e *Bijlsma*, che hanno acquistato grande importanza per gli studi sul cervello. Con questi vari metodi di esame, che possono essere soltanto brevemente accennati, è stato particolarmente facilitato in questi ultimi due decenni lo studio delle sostanze naturali. Desidero di ricordare qui brevemente i più importanti risultati di queste ricerche.

Al primo piano degli studi sistematici sulle sostanze naturali stanno in questi ultimi anni quelli sugli ormoni e sulle vitamine. In nessun altro campo si è lavorato con tanto accanimento e con così grande successo come in questo. Dieci anni fa il clinico aveva a disposizione tra gli ormoni di sicura efficacia soltanto l'adrenalina (Soprarenina) cristallizzata, ottenuta per sintesi da *Stolz*, e un estratto standardizzato ottenuto dal lobo posteriore

dell'ipofisi. Tutto quanto si trovava allora sul mercato medicamentoso, era costituito da preparati organici impuri, per lo più sostanze glandolari essiccate, della cui efficacia nessuno poteva garantire. Mancavano inoltre ancora metodi esatti di standardizzazione, che sono di grande importanza per queste ricerche. Ma successivamente con la elaborazione di sicuri metodi di saggio e col perfezionamento dei metodi microchimici di lavoro si riescì a penetrare sempre più nella cerchia dell'attività secretoria interna dei singoli organi, e a trarne gli increti attivi. Ecco le date storiche più importanti in questo campo di ricerche. Nel 1922 *Banting* e *Best* della Università di Toronto riuscirono per la prima volta, basandosi sui lavori fondamentali di *v. Mering* e *Minkowski* sul diabete pancreatico sperimentale pubblicati 33 anni prima, ad ottenere dall'apparato insulare del pancreas un estratto acquoso stabile, la Insulina, della quale oggi non possiamo neppure pensare si possa fare a meno nella cura del diabete mellito.

L'ultima tappa di questo cammino fu compiuta da *Abel* di Baltimora nel 1926, che ottenne per la prima volta dagli estratti greggi di Insulina il prodotto puro in forma cristallina. Ma ora che questa sostanza esiste, è nostro ulteriore compito di chiarirne mediante successiva decomposizione la costituzione molecolare e di ottenere la sintesi di sostanze insulino-simili. Studi preliminari del genere sono già in corso. Ricordo soltanto alcuni interessanti risultati ottenuti da *Abel*, *Jensen*, *Dudley* e *Freudenberg*.

I risultati finora ottenuti riguardano d'un lato la determinazione del peso molecolare dell'Insulina, che *Freudenberg* valuta a circa 18 mila; inoltre egli ha scoperto alcune linee caratteristiche dello spettro per l'Insulina. Ulteriormente fu constatato che l'Insulina è un albuminoide a peso molecolare elevato, che consta di vari aminoacidi noti e soggiace a tutte le leggi della digestione dell'albumina. In base a queste constatazioni non si può quasi pensare alla possibilità della somministrazione orale

dell'Insulina. Inoltre *Freudenberg* è riuscito a praticare alcune acilazioni ed eterificazioni e con ciò a determinare nell'Insulina vari gruppi imminici ed ossidrilici. Sembra anche, secondo le ricerche finora fatte, che per l'efficacia dell'Insulina siano indispensabili lo zolfo labilmente legato e un gruppo amminico separabile come ammoniaca.

Un altro evento importante nelle indagini sugli ormoni fu nel 1919 l'isolamento dalla glandola tiroide e la cristallizzazione ottenuta da *Kendall* di un amminoacido aromatico contenente jodio, la tirossina. La formula di costituzione fu chiarita alcuni anni più tardi (1926) dall'inglese *Harington*; la tirossina è l'etere diiodidrochinonico della diiodotirosina. Si sarebbe potuto credere che con la scoperta di questa sostanza tiroidea cristallizzata, iperattiva ed esattamente dosabile, il principio attivo della tiroide potesse, analogamente all'adrenalina, essere riportato a una sostanza relativamente semplice, a peso molecolare basso, all'ormone in senso proprio, e che con ciò il problema della terapia tiroidea fosse risolto in modo pienamente soddisfacente; ma da esatte analisi farmacologiche e chimiche è risultato ben presto che si tratta bensì di una sostanza assai attiva che esercita l'azione specifica dell'ormone tiroideo, ma che in Clinica la tirossina non è del tutto equivalente per effetto alla tireoglobulina. Data per os, essa è meno efficace e provoca più facilmente effetti accessori.

La tirossina è soltanto un gruppo prostetico della complessa tireoglobulina, e in questa forma semplificata viene scissa assai facilmente dall'organismo e resa rapidamente inattiva. Anche qui si può con sicurezza ammettere che accanto alla tirossina altre sostanze jodate sono contenute nel complesso tireoglobulina. Per questa ragione ci si è di nuovo rivolti alle sostanze tireoglobulina-simili di struttura molecolare più elevata e si è cercato di ottenere delle sostanze nelle quali fossero contenute delle ammine proteinogene jodate, legate nel complesso globulina. Con la collaborazione di *Blum* siamo riusciti ad isolare a

freddo dalla parte colloide della glandola tiroide una sostanza tireoglobulinica, solubile in acqua ed altamente attiva, che poté essere consegnata alla Clinica perchè è liberata di tutte le sostanze di zavorra, ben tollerata ed esattamente dosabile.

L' « Elityran », così è stata chiamata questa sostanza, rappresenta la forma « nativa » dell'ormone tiroideo. Esso è pertanto in quella forma o in una forma vicinissima, nella quale viene messo in circolo dalla glandola come increto. Con ciò si viene a chiudere un anello importante nella catena delle ricerche.

Prendendo come punto di partenza l'antica tireoglobulina di *Baumann* e *Oswald*, le indagini sono state proseguite fino alla decomposizione e alla sintesi della tirossina, e, poichè essa non basta pienamente alle esigenze cliniche, si tornò alle fonti originarie, ossia alla tireoglobulina, all'ormone nativo complesso, quale è secreto dalla glandola.

Collip ha isolato estratti attivi dalle paratiroidi, che influenzano il ricambio del calcio; essi hanno il potere di esercitare azione favorevole sulla tetania provocata dalla estirpazione delle paratiroidi.

Un'altra pietra fondamentale negli studi sugli ormoni è rappresentata dall'isolamento degli ormoni sessuali.

L'ormone sessuale femminile fu ottenuto in forma attiva dalle cavie per opera di *Allen* e *Doisy*; in seguito *Aschheim* e *Zondek* riuscirono a dimostrare questo ormone nell'urina di donne gravide e di cavalle gravide; pure dall'urina esso fu ottenuto in forma cristallina da *Butenandt*, *Doisy* e *Marrian*.

L'ormone sessuale maschile fu ottenuto dalla glandola sessuale maschile e dall'urina di maschi (*C. Funk*, *Gallagher*, *Koch*, *Loewe*, *Laqueur* ecc.). *Butenandt* ha recentemente isolato anche questo ormone in forma cristallina. Egli stesso e *Marrian* ne hanno recentissimamente determinato la costituzione. Secondo quanto se ne sa finora, i due ormoni sono assai strettamente vicini, e sembrano essere assai affini alle sterine.

Parallelamente a queste ricerche sugli ormoni sessuali si

sono svolte le ricerche sul lobo anteriore dell'ipofisi, della quale già oggi conosciamo ormoni differenti. Due tra essi sono in stretto rapporto con le funzioni sessuali e passano del pari nell'urina, in modo particolarmente abbondante all'inizio della gravidanza. Anche di questi ormoni sono in commercio dei preparati standardizzati. Secondo *Zondek* il lobo anteriore dell'ipofisi presiede alla funzione delle glandole sessuali e agisce come un motore delle funzioni sessuali. Anche l'attività della glandola tiroide è sotto il controllo di un ormone tireotropo, secreto dal lobo anteriore dell'ipofisi; anche questo increto è già stato isolato come frazione a sè. Un altro ormone del lobo anteriore dell'ipofisi è quello assai labile dell'accrescimento; esso fu trovato e caratterizzato da *Evans*.

Vanno inoltre ricordati gli interessanti lavori di *Kamm* ed *Aldrich*, che hanno scomposto in due frazioni farmacologicamente differenziabili l'increto misto del lobo posteriore dell'ipofisi; una frazione che agisce esclusivamente sulla muscolatura liscia dell'utero ed è contenuta nell'Orasthin, che trova esclusiva applicazione in ostetricia. L'altra frazione dell'increto agisce sulla muscolatura liscia dell'intestino e dei vasi sanguigni, sicchè viene usata in Clinica come tonico intestinale e come rimedio vasomotore. Inoltre essa ha una spiccata azione sulla eliminazione dell'urina nel senso di inibirla, tanto che è usata con successo nel diabete insipido; questa frazione è contenuta nella Tonephin.

Entrambe queste frazioni dell'increto sono già in istato di straordinaria purezza e sono circa 100 volte più attive della glandola essiccata. Secondo le ricerche farmacologiche e cliniche finora eseguite è verosimile che nella frazione tonicizzante l'utero sia contenuta una sostanza specifica, sicchè appare possibile di ottenere, dopo ulteriore separazione delle sostanze di zavorra aspecifiche, un composto cristallino. La frazione Tonephin sembra rappresentare tuttora una miscela di vari increti, ed è ovvio di tentare un'ulteriore separazione di vari componenti farmacologicamente attivi.

Finora non si è trovato campo di applicazione in Clinica per l'ormone presente soprattutto nel lobo medio (Intermedin); esso agisce, secondo quanto risulta dalle ricerche fatte finora, sui cromatofori di vari animali a sangue freddo.

Tuttavia ad onta dei molti interessanti risultati ottenuti nel campo degli ormoni, la maggior parte dei quesiti inerenti aspetta ancora soluzione. Non sappiamo ad es. ancora se nel lobo posteriore dell'ipofisi si formi soltanto un unico ormone; *Abel* è incline ad ammetterlo e ritiene che elaborando gli estratti di lobo posteriore si verranno a separare da questo ormone originario gruppi prostetici con azione fisiologica differente. Non sappiamo ancora nulla di definitivo sugli stretti rapporti alterni tra lobo anteriore dell'ipofisi e apparato germinativo, specialmente durante la gravidanza. Non possiamo ancora dire con sicurezza se gli ormoni sessuali eliminati coll'urina siano identici agli increti contenuti nelle glandole sessuali. Non sappiamo ancora nulla di sicuro sulla natura della sostanza epatica (quale è presente nel Campolon) che esercita un'azione così favorevole sull'apparato emopoietico nell'anemia perniciosa. Ad onta di molti sforzi finora non si è ancora riusciti ad ottenere increti attivi dal timo, dalla epifisi e dalla milza, ai quali organi si devono indubbiamente ascrivere funzioni secretorie interne. Anche sull'ormone dei surreni non possiamo dire nulla di sicuro; eppure si tratta certamente di un increto di importanza vitale, forse dell'increto della maggiore importanza vitale che l'organismo produca. Secondo quanto hanno riferito numerosi autori, cogli estratti acquosi si ottiene un prolungamento della vita di animali a sangue caldo ai quali si siano estirpati i surreni. Secondo le ricerche più recenti l'ormone surrenale ha anche una influenza decisiva sul ricambio degli idrati di carbonio.

Di un altro gruppo di sostanze del tipo degli increti desidero di riferire brevemente: si tratta degli ormoni dei tessuti, che in vista della loro universale presenza si possono contrapporre agli ormoni veri e propri. Di essi sono state studiate in

questi ultimi tempi le sostanze proprie dell'organismo, che hanno azione sul circolo: istamina, colina, acetilcolina, kallikrein (Padutin), nucleotidi e nucleosidi. Questi ultimi sono stati recentissimamente studiati chimicamente nel modo più esatto. Nei muscoli dello scheletro e negli organi ricchi di nuclei cellulari esiste dell'acido adenosintrifosforico; mediante decomposizione fermentativa o chimica, esso può essere scisso, nell'organismo e in particolari condizioni anche in vitro, nell'acido adenilico dei muscoli e in adenosina. Composti di costituzione simile, la cui esatta struttura non è stata ancora studiata, esistono in altri organi, nonchè negli eritrociti e anche nei fermenti.

Secondo le determinazioni di costituzione finora fatte l'acido adenilico muscolare è un glucoside che consta di ribosio e adenina, e che è eterificato all'atomo di carbonio terminale del radicale zuccherino con un acido o-fosforico.

La legatura di ulteriori radicali fosforici negli acidi adenosinpolifosforici non è ancora nota in dettaglio. Tutti questi nucleotidi e nucleosidi esistono nei singoli preparati medicamentosi che sono stati usati per la cura di varie malattie circolatorie (Lacarnol, Sarkolyt). Le ricerche fisiologiche hanno dimostrato che questi nucleosidi sono probabilmente i regolatori fisiologici della irrorazione coronaria e dei muscoli scheletrici. I preparati medicamentosi da essi ottenuti hanno dimostrato in ricerche farmacologiche un'azione dilatatrice elettiva sui vasi coronari e vengono pertanto soprattutto raccomandati per la cura dell'angina pectoris e degli stati morbosi affini.

Un posto importante si è acquistato in questi ultimi anni l'ormone circolatorio kallikrein (Padutin), ottenuto da *Frey e Kraut* dal pancreas. Da qui esso giunge in forma attiva nella corrente sanguigna, dove per azione di un inattivatore è in massima parte inattivato. Nell'urina riappare in forma attiva in quantità relativamente grande. La composizione chimica di questa sostanza assai attiva non è ancora nota, tuttavia essa si differenzia essenzialmente dalle altre sostanze note, che hanno azione sul cir-

colo (istamina, colina, acetilcolina e acido adenilico). Farmacologicamente è caratterizzata da un'azione vasodilatatrice, con che viene diminuita la resistenza alla circolazione arteriosa, viene aumentata la massa di sangue espulsa dal cuore, aumentato il volume - minuto, la circolazione sanguigna viene accelerata e la pressione sanguigna abbassata.

Un altro gruppo di sostanze abbassanti la pressione fu trovato in vari organi, tra altro nei reni; recentemente queste sostanze furono isolate e studiate nelle loro azioni fisiologiche da *Felix* e *Lange*. Ancora non si sa quale reciproca parentela abbiano queste sostanze e se ad esse spetti una importanza fisiologica; altrettanto si deve dire delle sostanze aumentanti la pressione sanguigna estratte recentemente da *Collip* da vari tessuti, nonchè della vagotonina. Della natura chimica e dei rapporti di tutte queste sostanze specifiche nulla ancora si sa.

Tra le vitamine soprattutto quattro sono state finora studiate a fondo: le due vitasterine A e D, e i fattori idrosolubili B e C. Il fattore antirachitico, che in base alle ricerche di *Windaus* e suoi collaboratori, nonchè di studiosi inglesi e americani, fu ottenuto mediante irradiazione dell'ergosterina e usato come rimedio prezioso in terapia, è attualmente noto anche in forma cristallizzata. Non molto si può ancora dire riguardo alla sua costituzione; è un isomero dell'ergosterina, dalla quale ha origine per trasposizione intramolecolare. Appartiene dunque al gruppo delle sterine, alla cui struttura molecolare recentemente noi poniamo a base l'anello del fenantrene o quello del crisene.

Il fattore A, la vitamina antixeroftalmica e dello sviluppo, è stato ancora poco studiato. Abbiamo in questo campo le recenti ricerche di *Euler*, *Karrer*, *Kuhn* e altri, dalle quali appare verosimile che la Vitamina A sia in strettissimo rapporto con le sostanze coloranti vegetali, in particolare con la carotina.

Le ricerche antecedenti di *Eijkman* sul gruppo Vitamina B, cui seguì la preparazione per opera di *Donath* e *Jansen* della vitamina antiberica cristallizzata, sono state più recente-

mente proseguite da *Windaus*. Egli poté isolare dal lievito, che contiene la Vitamina in misura particolarmente abbondante, sali cristallizzati di una sostanza che dimostrarono di possedere l'azione della Vitamina B in grado molto maggiore dei preparati antecedentemente ottenuti dalla crusca di riso. In base alle analisi fatte finora, *Windaus* ha formulato per la base Vitamina libera, una formula bruta che, oltre a carbonio e idrogeno, contiene azoto, ossigeno e zolfo.

Anche il fattore C, la Vitamina antiscorbutica, è stato recentemente studiato da parecchie parti. *Rygh*, isolando questa sostanza dai frutti freschi, ha ottenuto una sostanza cristallizzata che è simile alla narcotina, e ne ha arguito che la narcotina, che egli poté del pari dimostrare abbondantemente nei frutti immaturi, va considerata come provitamina del fattore C. Con la maturazione dei frutti si trasformerebbe mediante demetilazione parziale nella Vitamina vera e propria. *Rygh* ha ottenuto per via sintetica questa narcotina parziale demetilata, la quale ha nelle cavie una spiccata azione antiscorbutica. I dati sperimentali di *Rygh* sono stati recentemente sottoposti a controprova da altri autori, ma non furono confermati. Pertanto è dubbio che la Vitamina C sia un derivato della narcotina.

Molto più verosimili appaiono i reperti recentemente rilevati da *Szent-Györgyi*, il quale riescì ad ottenere da un uguale materiale di partenza vegetale, ma anche dalla corteccia surrenale, una sostanza cristallina, che addimosta nelle cavie una spiccata azione antiscorbutica. L'analisi ha dimostrato che questi cristalli constano di acido chetouronico, isomero dell'acido glicuronico. Nostre ricerche di controllo hanno confermato i risultati delle ricerche di *Szent-Györgyi*.

Le molte ricerche sui fermenti e sugli enzimi non hanno finora approdato ad alcun enzima puro; attualmente vengono usati in terapia soltanto alcuni fermenti digerenti greggi, ad es. i preparati di pepsina e di pancreas.

Ma ci valiamo indirettamente di queste ricerche sui fermenti,

in quanto che usiamo queste sostanze come mezzo sussidiario per ottenere dei rimedi, oppure trasportiamo la metodica usata per essi per la preparazione di prodotti puri in altri rami della terapia. Così i vari metodi di adsorbimento, che *Willstätter* e collaboratori hanno elaborato per la depurazione e l'isolamento dei fermenti, sono stati applicati per l'isolamento di ormoni e di tossine. Queste sostanze si possono ad es. ottenere mediante adsorbimento da parte di silicati (bentonit) o di ossido di alluminio, ossido di ferro ecc. e successiva eluizione in forma pura, altamente attiva. Anche per le ricerche di decomposizione parziale i metodi in uso per i fermenti possono essere adoperati con successo. Si riesce per es. mediante amino-polipeptidasi e proteasi, quali furono ottenute da *Waldschmidt-Leitz*, a trasformare frazioni di ormoni in preparati più puri, più liberi di sostanze di zavorra. Infine gli enzimi e i fermenti furono recentemente usati anche per reazioni tecniche di trasformazione e di sintesi, ad es. per la sintesi di alcaloidi otticamente attivi. Tali metodi furono finora applicati con successo all'efedrina e a vari suoi derivati. Dalla benzaldeide si può ottenere con processo fermentativo in soluzione acquosa un fenilacetilcarbinolo levogiro, dal quale ha origine per riduzione catalitica in presenza di metilammina la efedrina levogira. Essa è identica al prodotto naturale. In tal modo si riesce ad ottenere anche una serie di altri derivati della serie Soprarenina ed efedrina. Variando le condizioni è possibile di ottenere la forma otticamente attiva o la forma racemica.

Tali metodi di fermentazione furono usati anche per la sintesi degli zuccheri semplici. Così il più semplice chetotriosio, il diossiacetone (Oxantina), fu ottenuto dalla glicerina facendo agire batteri del sorbosio. Questo interessante zucchero è dotato di azioni antichetogene e al pari di altri carboidrati viene utilizzato dall'organismo. Esperienze su diabetici hanno dimostrato che questo zucchero, similmente alla sorbite (Sionite) e allo zuc-

chero caramellato, quali sono presenti nei glicosani, può essere dato in sostituzione dei carboidrati.

Anche nel campo degli alcaloidi e dei glucosidi si sono fatte grandi serie di ricerche. Il quesito più importante per la preparazione di nuovi rimedi del gruppo degli alcaloidi è questo: La pianta dà sempre un prodotto optimum e per efficacia terapeutica e per tolleranza e atossicità?

A questo quesito non si può rispondere in modo perentorio; ricorderò soltanto alcuni dati.

Riguardo alla cocaina le ricerche fatte finora hanno dimostrato che essa è bensì un anestetico locale, ma che è anche molto tossica. I molti lavori che sono stati fatti nel corso degli anni per ottenere per via sintetica degli anestetici in sostituzione della cocaina hanno dimostrato che attualmente possiamo benissimo fare a meno della cocaina stessa. Abbiamo una serie di anestetici per infiltrazione, di anestetici di conduzione e di anestetici delle mucose (Novocaina e Pantocain), che agiscono almeno altrettanto bene, che a minore concentrazione danno risultati uguali a quelli della cocaina e sono meno tossici. A questi prodotti sintetici mancano soprattutto gli spiacevoli effetti accessori della cocaina, specialmente il senso di euforia e l'assuefazione, che rendono la cocaina così pericolosa. Non hanno però neppure, come tutti gli anestetici sintetici finora ottenuti, l'azione vaso-costrittrice.

Le condizioni sono diverse nella chinina. Non possiamo ancora fino ad oggi riunire in un prodotto sintetico tutte le azioni parziali della chinina, come l'azione antipiretica, quella sui plasmodi della malaria, quella debolmente analgesica e quella sul ricambio, ma già oggi siamo in grado di ottenere con vari prodotti sintetici i singoli effetti della chinina e in certi casi anzi di sorpassarli.

Ricordo la cairina, la cairolina e la tallina, derivati della chinolina, che hanno la stessa azione antipiretica della chinina, nonché i derivati dell'antipirina che sono più attivi della chinina

per azione antipiretica e analgesica; ricordo gli antimalarici sintetici come la Plasmochina, che ha in parte l'effetto della chinina, anzi per quel che riguarda i gameti è ad essa superiore. Anche con una serie di derivati dell'acridina (Atebrin) possiamo ottenere l'effetto antimalarico della chinina, specialmente l'effetto sugli schizonti.

Nel campo di altri studi sugli alcaloidi, ad es. nella serie degli alcaloidi dell'oppio, si può portare un gran numero di esempi, i quali dimostrano che gli alcaloidi, quali la natura ci fornisce, non sempre rappresentano i rimedi migliori. Appare dunque razionale di completare l'isolamento e la preparazione allo stato di purezza di tali basi vegetali con ricerche volte ad ottenere per sintesi nuove sostanze con principio attivo simile.

Nel campo dei glucosidi non siamo molto progrediti. Dobbiamo accontentarci di usare a scopo curativo esclusivamente i glucosidi naturali, parecchi dei quali abbiamo però in forma pura cristallina; con essi sono già stati fatti lavori fondamentali (da *Windaus*, *Kiliani*, *Mannich*, *Jacobson*, *Stoll* e altri).

Specialmente nella serie delle sostanze attive della digitale abbiamo avuto in questi ultimi tempi risultati importanti; in base ad essi possiamo interpretare le genine (agliconi) come lattoni sterinici. I più importanti radicali zuccherini, che sono di importanza sostanziale per l'effetto e la fissazione del veleno nei ventricoli cardiaci, appartengono al gruppo dei pentosi (desossipentosio, metil-desossipentosio). In stretti rapporti con i glucosidi genuini stanno i veleni del rospo recentemente studiati da *Wieland* e *Chen*, veleni che hanno pure un effetto elettivo sul cuore. In questi, secondo le ricerche più recenti, è contenuto in luogo dello zucchero l'aglicon (ad es. bufotaleina), una suberilarginina. Basandosi su questa nozione, sono già state fatte sintesi parziali delle sostanze contenute nella digitale; non si hanno però ancora risultati pratici.

Occupiamoci infine di un altro importante argomento, quello dei sieri e dei vaccini.

A punto di partenza dalla scoperta di *Emilio von Behring*, che per primo richiamò l'attenzione, in base a immunizzazioni sistematiche negli animali, sulla importanza pratica della formazione di anticorpi, nel corso di questi ultimi 40 anni fu preparato un gran numero di sieri curativi, in parte antitossici, in parte antibatterici o battericidi. Parallelamente a questi lavori, si svolsero altri studi che fecero scoprire a *Roberto Koch* la tubercolina vecchia e nuova, e portarono all'applicazione a scopo immunizzante delle più varie tossine e delle culture pure, in parte con bacilli uccisi, in parte con bacilli di virulenza ridotta. In entrambi questi campi la sierologia e la batteriologia hanno contribuito finora con un materiale prezioso d'un lato in forma dei sieri curativi specifici, d'altro lato in forma di tossine e vaccini specifici. L'evento più importante in questo campo è la vaccinazione antidifterica con miscele di tossina e antitossina, la vaccinazione contro la tubercolosi secondo il metodo di *Calmette* con stipiti di bacilli della tubercolosi particolarmente preparati e indeboliti nella loro virulenza, e la somministrazione orale di vaccini onde ottenere una immunizzazione attiva, ad es. contro le infezioni tifica e colerica. Anche in questo campo si è fatto un grande lavoro dalla scoperta dei primi sieri e vaccini in poi. Così si è ad es. riusciti a liberare, per via elettrosmotica e anche mediante determinati metodi di salificazione, i sieri curativi da certe sostanze di zavorra, e a isolare dall'albumina del siero contenente anticorpi quella frazione che è particolarmente ricca in antitossina. Con ciò vengono in pari tempo eliminate quelle frazioni di albumina che provocano nell'uomo reazioni accessorie indesiderate, e il preparato è assai meglio tollerato, nonchè più efficace. Questo metodo ha permesso anche di preparare miscele di antitossine con efficacia assai elevata, nonchè i così detti sieri poveri di albumina, che ad onta di un basso contenuto in albumina mantengono la loro elevata efficacia.

Anche i metodi di vaccinazione sono stati vantaggiosamente perfezionati, ad es. usando stipiti determinati di batteri, con che

si ottiene nella immunizzazione attiva un effetto più specifico e più profondo (ad es. stipiti polivalenti di gonococchi).

Ma nel grande campo dei sieri e dei vaccini il lavoro principale è ancora da fare; esso spetta in prima linea al chimico. Ma proprio in questo campo lo studio chimico presenta difficoltà straordinariamente grandi, perchè non sappiamo ancora molto sulle singole sostanze albuminoidi.

Tre grandi campi di studio ci attendono; in primo luogo la depurazione chimica dei sieri rispetto alle sostanze di zavorra, ossia l'isolamento quanto maggiore possibile della frazione specifica di antitossina. Lo studio di questo problema porterà probabilmente luce anche in molti quesiti teorici, soprattutto in quelli delle proprietà chimiche e fisiche dell'antitossina.

Il secondo campo di studio sta su una direttiva simile: l'isolamento di albuminoidi batterici specifici, ossia di quelle sostanze che nel processo della immunizzazione attiva entrano in reazione con l'organismo. In questo campo i lavori fondamentali di *Heidelberger* hanno dimostrato che si riesce ad ottenere gli antigeni dei pneumococchi allo stato di purezza in forma di sostanze simili ai carboidrati, sostanze la cui costituzione non è però ancora chiarita. Recentemente noi siamo riusciti a trovare dei metodi scientifici coi quali si possono isolare da un gran numero di batteri, come i bacilli del tifo, i vibrioni del colera, i bacilli della peste, i gonococchi ecc. la frazione attiva in forma esente da albumina; all'uopo abbiamo usato varî procedimenti biologici di scissione. Anche qui sembra si tratti essenzialmente di sostanze carboidrati-simili, che non danno più alcuna reazione dell'albumina, ma reagiscono positivamente alla prova di *Molisch* e con ciò possono essere caratterizzate nella loro proprietà specifica di essere precipitate da un siero specifico.

Nel terzo campo di lavoro, ossia in quello della depurazione o dell'isolamento, e della nozione dei caratteri particolari delle tossine batteriche abbiamo fatto in questi ultimi anni un passo

avanti; in primo luogo rispetto alla determinazione farmacologica di tali tossine. Da ricerche di *Schübel* sappiamo che ad es. nella tossina del botulismo è contenuto un veleno genuino dei nervi; in particolare la innervazione motoria viene del tutto paralizzata da dosi relativamente piccole di tossina.

Con esperienze personali io ho dimostrato, quando ero nell'Istituto di *Straub*, che la tossina della gangrena gasosa ad dimostra nelle fasi terminali del suo effetto un meccanismo di azione simile a quello che noi conosciamo nella morte da digitale; in tempi più recenti sappiamo da ricerche elettrocardiografiche di *Josephtal* nell'avvelenamento sperimentale con tossina difterica, che questa ultima è un veleno specifico del cuore.

Già da lungo tempo si è cercato di chiarire la chimica di questi veleni. Recentemente *Seibert* e *Long* (Chicago) hanno trovato che dai brodi di cultura nonchè dal bacillo tubercolare stesso si può isolare una proteina cristallizzata, che ha tutte le proprietà della tubercolina vecchia. Noi stessi abbiamo fatto ricerche nella medesima direttiva e abbiamo potuto ottenere una tubercolina priva di albumina, che ha del pari tutte le proprietà finora note della tubercolina vecchia di *Koch*. Secondo le ricerche finora fatte sembra che la struttura chimica di questo veleno sia affatto simile ad es. a quella della tireoglobulina o dell'emoglobina. Abbiamo qui come molecola complessiva una globulina, nella quale il gruppo specifico è contenuto nella forma del così detto gruppo prostetico. Nella tireoglobulina il gruppo prostetico è la tirossina, nell'emoglobina la emina, nella tubercolina, come noi abbiamo potuto constatare, un peptide molto attivo, di peso molecolare relativamente basso, che ha tutte le proprietà della tubercolina. Condizioni del tutto simili troviamo nella tossina del gruppo coli (coli, tifo, paratifo, X 19, dissenteria dei vitelli ecc.), nella quale noi abbiamo potuto isolare dai corpi batterici nonchè dalle culture in brodo, tossine prive di albumina, con le quali abbiamo potuto ottenere reazioni specifiche e tra altro reazioni febbrili. Questi

risultati hanno finora soltanto interesse teorico. Essi dimostrano però che accanto alle tossine genuine, alle quali è stata finora rivolta soprattutto l'attenzione, i batteri possono formare anche tutta una serie di sostanze tossiche, la cui importanza per lo svolgimento del processo infettivo potrà essere studiata in dettaglio soltanto quando si sarà riusciti a isolarle chimicamente. Anche in questo campo il chimico deve precedere nel lavoro il biologo e il clinico, onde formare le basi di ulteriori cognizioni.

Non era naturalmente possibile di dare con questa breve relazione un quadro esauriente dei risultati finora ottenuti negli studi delle sostanze naturali. Ho potuto soltanto accennare alle direttive nelle quali ci muoviamo; credo però di avere dimostrato quanto si sia lavorato in questi ultimi 20 anni nel campo degli studi sulle sostanze naturali e quanto importanti risultati questi studi abbiano dato.

Molto terreno vergine sta però ancora dinanzi a noi; ogni modesto risultato di singole indagini prospetta quesiti nuovi; molto ancora si deve lavorare in ogni singolo campo prima di poter riunire il tutto in un complesso armonico, di poter vedere ben più addentro nell'intimo dei processi naturali. Collaborare a questi studi è in prima linea compito della medicina e delle scienze naturali; tra esse sta, come territorio di confine, la farmacia.

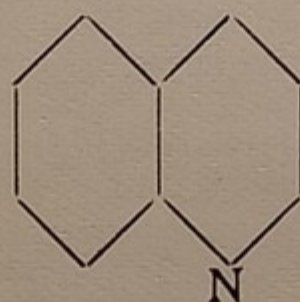
Preparati acridinici chemioterapici

* PROF. DR. PHIL. DR. MED. h. c. L. BENDA

Francoforte s. M. - Hoechst.

La chemioterapia di infezioni batteriche mediante composti sintetici fu inaugurata da *Morgenroth* e suoi collaboratori che studiarono una serie di sostanze preparate da *Thron*, e trovarono tra altre particolarmente attive la etilidrocupreina (Optochina) contro i pneumococchi, la isoamilidrocupreina (Eucupina) contro i bacilli della difterite e la isooctilidrocupreina (Vuzina) contro gli streptococchi e gli anaerobi (vedi tra altri *Braun* e *Schäfer*, *Bieling*).

Questi preparati sono omologhi della diidrochinina; derivano quindi dalla chinolina (I).



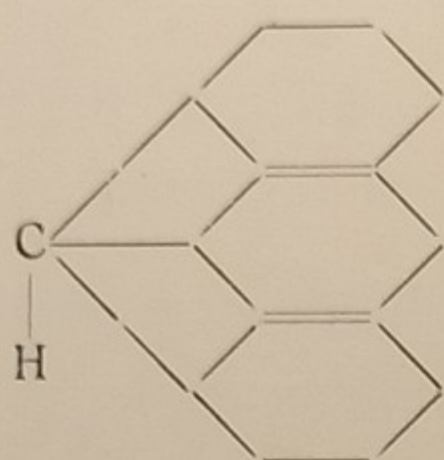
(I)

Ulteriori progressi si fecero con la elaborazione dei composti acridinici.

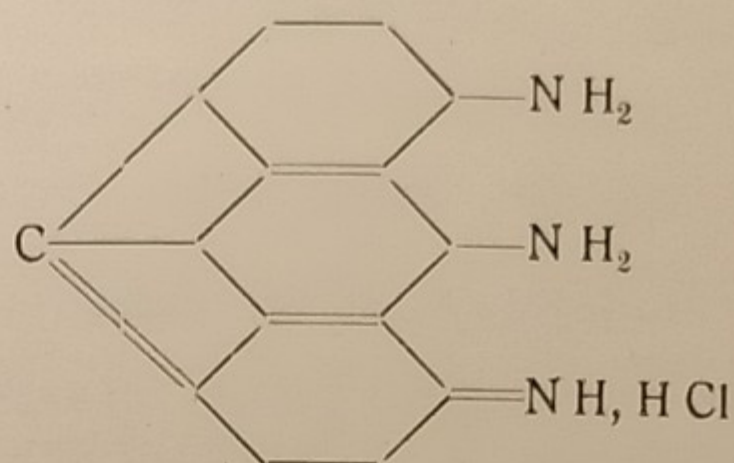
Benchè *Tappeiner* e *Jodlbauer* già quasi 40 anni fa abbiano sperimentato in vitro un derivato acridinico, la così detta fosfina, rispetto alla sua azione protozoicida, e *Mannaberg* abbia sperimentato lo stesso preparato nell'uomo contro la malaria, (senza per altro ottenerne risultati utilizzabili), lo studio sistematico dei preparati acridinici cominciò soltanto 15 anni più tardi. Riuscirà forse interessante a qualcuno dei lettori di sapere per quale caso *Paolo Ehrlich*, il fondatore della moderna chemioterapia, e i suoi collaboratori abbiano rivolto particolare attenzione a questo gruppo di composti.

Molti studiosi avevano sperimentato le sostanze coloranti a base di trifenilmetano, sostanze che al pari della fucsina, della

parafucsina (III), del violetto di metile ecc., derivano dal trifenilmetano (II)



(II)



(III)

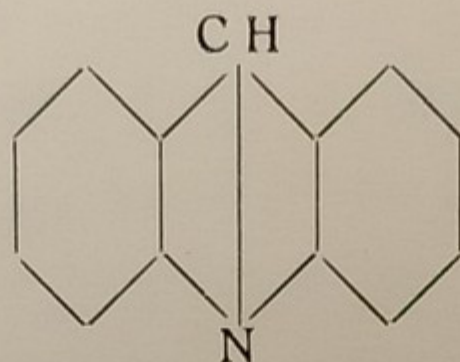
e che dimostrarono in vitro e nelle esperienze sugli animali una certa azione verso microrganismi patogeni. *Ehrlich* le aveva dapprima sperimentate contro i tripanosomi. Esse presentavano però una notevole tossicità, e poichè secondo l'opinione di *Ehrlich* ciò dipendeva dalla loro forte basicità, egli incaricò i suoi chimici di cercare derivati della fucsina che fossero meno basici. Infine si trovò nella dicloroparafucsina un composto, che pure essendo poco tossico, era di molto superiore per azione tripanocida alla sostanza originaria, la parafucsina, nonchè a tutte le sostanze coloranti del gruppo trifenilmetano fino allora note. Dei topi infettati di nagana poterono essere sicuramente salvati con una sola iniezione di una dose ben tollerata, e del pari con la somministrazione orale mediante la sonda di *Mark* ⁽¹⁾.

Ma quando si è trattato di ottenere grandi quantità di questo prodotto (cui era stato dato il nome di trypanosan) allo stato puro e si è all'uopo usato un nuovo metodo di preparazione, il preparato ottenuto, particolarmente accurato e puro, non esplicò affatto la spiccata azione di quello originario, ottenuto col così detto metodo della fucsina (fusione con acido arsenico). Un esame più approfondito dimostrò che il preparato antico conteneva una impurità e che a questa doveva essere ascritto l'effetto particolarmente buono. Questo composto misterioso si rivelò essere un derivato acridinico fino allora sconosciuto, che

(1) Il primo preparato col quale si riuscì a far guarire senza recidive mediante una sola iniezione un topo infettato con dose sicuramente mortale, applicando quindi una terapia sterilizzante magna nel senso di *Ehrlich*, fu il Rosso Trypan di *Weinberg*, un azocolorante.

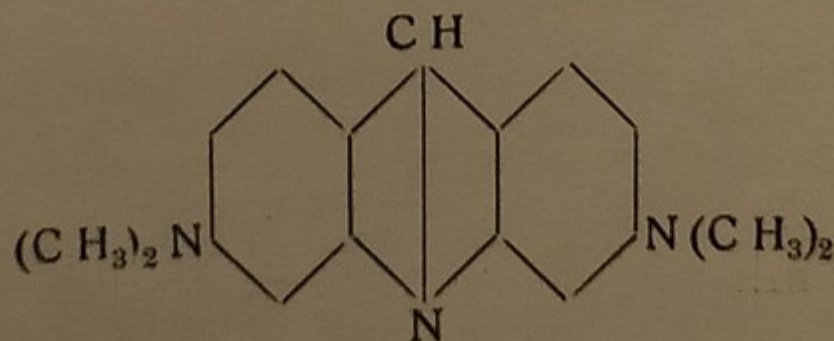
deve la sua produzione a una reazione secondaria, una così detta ortocondensazione. Ora si sapeva in quale campo si doveva ulteriormente studiare per ottenere sostanze particolarmente attive: nella serie acridinica.

La sostanza fondamentale dei derivati acridinici, l'acridina (IV), è contenuta nel catrame di carbon fossile. Non può essere



(IV)

usata come rimedio per la sua elevata tossicità e per la sua spiccata azione irritante locale; neppure è utilizzabile come materiale di partenza per la preparazione di derivati acridinici usabili in terapia, poichè i prodotti di trasformazione da essa finora ottenuti non hanno valore per la medicina. Ma già al tempo delle ricerche suddescritte erano noti numerosi derivati dell'acridina, importanti per l'industria tessile come coloranti. Gli studi sistematici fatti in questo campo dalla scuola di *Ehrlich* furono naturalmente rivolti a sperimentare come tripanocidi questi coloranti acridinici, come il giallo di acridina, l'arancio di acridina, la diamantfosfina ecc., tutti derivati acridinici amidati; e tra essi si trovarono effettivamente composti molto attivi. Purtroppo però il loro indice chemioterapico, ossia, come è ben noto, il rapporto tra $\frac{dc}{dt} = \frac{\text{dose curativa}}{\text{dose tollerata}}$, è troppo sfavorevole per giustificare esperienze sull'uomo. Risultò in particolare che i prodotti alchilati nei gruppi amminici, come ad es. l'arancio di acridina (V), erano

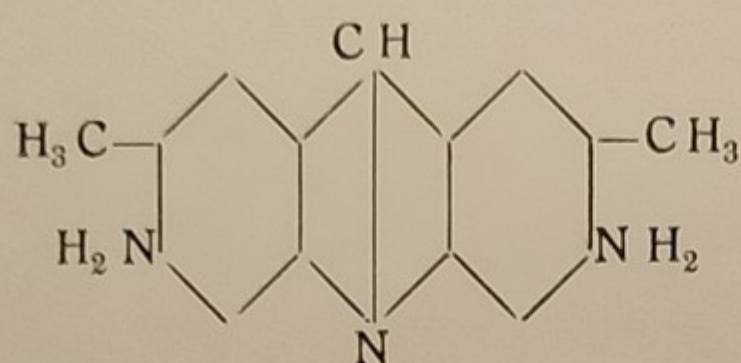


Arancio di acridina (Base)

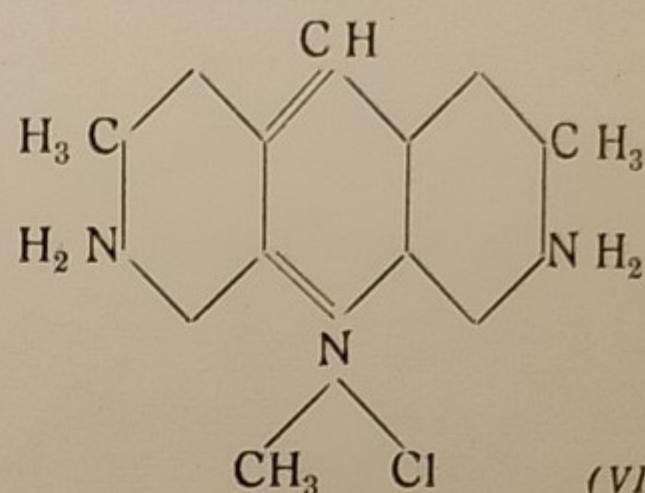
(V)

assai attivi ma anche assai tossici, sicchè ci si volse ai preparati con gruppi amminici primari (NH_2). Di essi era allora noto,

oltre alla fosfina già ricordata e alla benzoflavina del pari senza valore in terapia, soltanto il giallo di acridina (VI) che risultò meno tossico, ma anche di gran lunga meno efficace dell'arancio di acridina; inoltre il composto corrispondente di acridinio (VII) di *F. Ullmann*, che era già dotato di proprietà molto migliori.

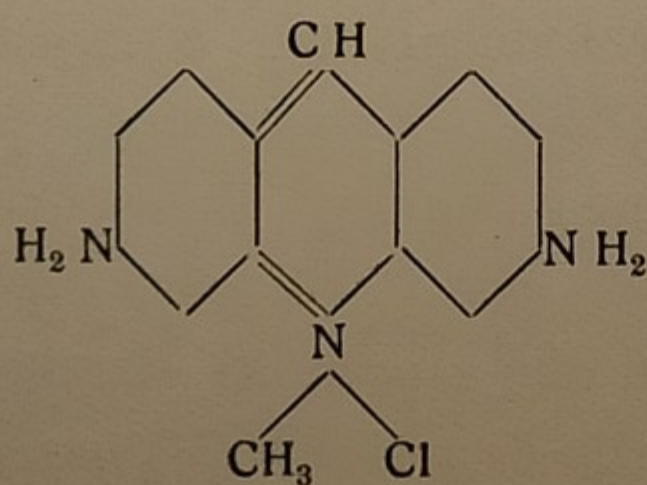


Giallo di acridina (Base) (VI)

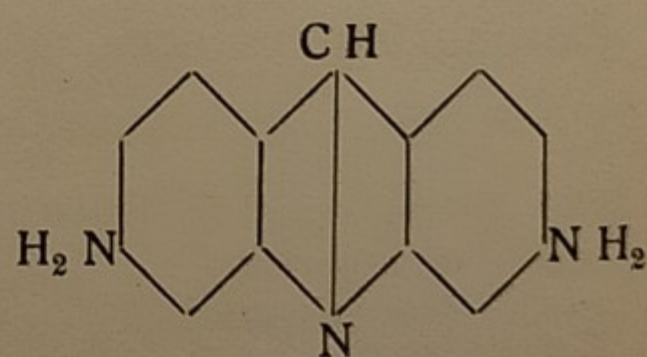


(VII)

Ma *Ehrlich* non si diede per vinto, e poichè in base a ricerche antecedenti egli aveva ascritto una influenza sfavorevole (disterapeutica) ai gruppi metilici uniti direttamente al nucleo acridinico, che sono contenuti in numero di due nel giallo di acridina e nel giallo di acridinio, volle fosse cercato un mezzo per ottenere il composto fino allora ignoto privo del nucleo metilato, il che riuscì dopo che, provate molte false strade, il prodotto intermedio 3,6 diamminoacridina (IX) fu reso facilmente accessibile.



(VIII)



Diamminoacridina (IX)

Il nuovo composto ebbe il nome di Tripaflavina, d'un lato per la buona sua azione osservata in esperienze sugli animali contro i tripanosomi, d'altro lato per il suo colore giallo; nome che gli è rimasto, quantunque oggi si sappia che non ha praticamente importanza come rimedio dei tripanosomi. I buoni risultati che *Ehrlich* ne ottenne nel nagana non poterono essere confermati per altre tripanosomiasi, in particolare per la ma-

lattia del sonno dell' uomo, per quanto taluni studiosi abbiano ottenuto in Africa risultati relativamente favorevoli combinando la Tripaflavina a certi arsenicali, ad es. all'arsenofenilglicina.

Invece l'interesse per il preparato si rinnovò quando *Browning*, ex scolaro di *Ehrlich*, e suoi collaboratori riconobbero che la Tripaflavina esercita una spiccata azione sui germi infettanti delle ferite, azione che non è, come avviene per altri antisettici, inibita dalla presenza di siero, anzi ne è rafforzata. In Inghilterra il preparato fu largamente usato, anche nei Lazzeretti da campo durante la guerra mondiale, per le ferite infette, e non poche amputazioni poterono essere evitate mercè l'uso tempestivo della Tripaflavina, o, come gli inglesi chiamavano il preparato, dell'acriflavina.

Da allora il campo di applicazioni della Tripaflavina si è assai allargato; invero il preparato agisce sui più vari germi morbosi, più precisamente in qualità di chemioterapico genuino anche per la via del sangue.

In molti luoghi si sperimentò la sua azione in vitro, in animali e in clinica. Esso già ad altissima diluizione esercita effetto inibitore su tutti i germi di infezione delle ferite (*Kolle*, *Ritz*, *Schlossberger*), anche sui germi dell'edema maligno (*E. Fränkel*). *Braun*, *Neufeld*, *Schiemann*, *Fürstenau* e altri confermarono la straordinaria azione da esso esercitata su streptococchi, gonococchi, meningococchi, bacilli della difterite, bacilli di Shiga-Kruse.

L'azione terapeutica della Tripaflavina viene favorita dal suo elevato potere di diffusione e dal fatto che essa inibisce la fagocitosi soltanto in concentrazione abbastanza elevata. Poichè le sue soluzioni diluite non sono irritanti, può essere applicata localmente anche nelle affezioni delle mucose.

Tra le indicazioni recentemente trovate ricordo la piroplasmosi dei cani e dei bovini, che, secondo le ricerche di *Kikuth* e *Domagk*, e secondo quanto si è constatato in Africa, è assai favorevolmente influenzata dalla Tripaflavina. Si riuscì regolarmente con una dose di 10-15 mgr. pro Kg. di peso corporeo,

iniettata intravene due volte con un intervallo di una settimana, a far scomparire durevolmente i parassiti tanto nello stadio acuto, quanto in quello cronico, e a guarire completamente gli animali. Siccome le dosi più basse non evitano negli esperimenti sugli animali le recidive e provocano eventualmente resistenza al rimedio, vengono raccomandate dosi quanto più possibile alte. Il preparato sembra fallire nelle teileriosi, mentre dà buoni risultati nella febbre di Malta.

Molto si è già lavorato rispetto al quesito del meccanismo di azione dei rimedi chemioterapici in genere, di quelli acridinici in particolare. Tra le due concezioni estreme: azione anti-parassitaria diretta (distruttrice e inibente lo sviluppo) e azione indiretta mediante peggioramento del terreno alimentare, mobilitazione delle forze difensive dell'organismo, formazione di anticorpi mediante uccisione in primo tempo di pochi parassiti, che poi comporta per la messa in libertà di antigeni maggiore produzione di anticorpi, stanno le concezioni mediane, che ammettono l'azione contemporanea dei suddetti fattori. Per la Tripaflavina in particolare, *Jancsó* ha recentemente dimostrato in modo elegante e sicuro l'azione diretta sui tripanosomi; ciò dopo che da 4 anni *Werbitzki* aveva constatato che i tripanosomi resistenti alla Tripaflavina hanno perduto il loro blefaroblasto, il che per altro non pregiudica quasi, secondo *Gonder*, la loro virulenza.

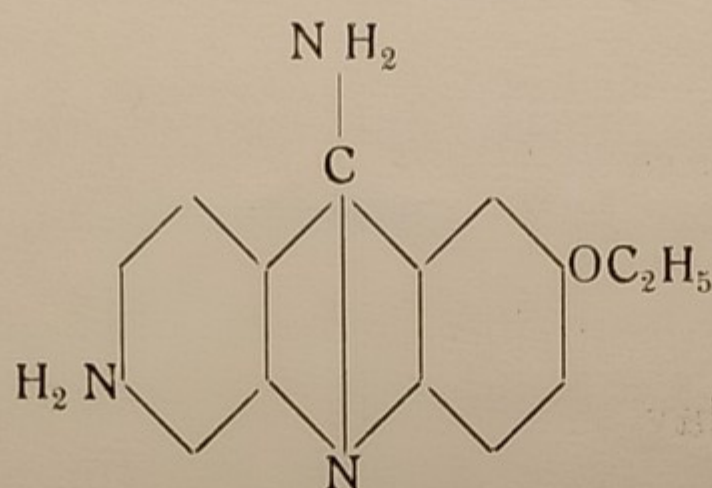
Come si produca l'azione battericida della Tripaflavina, non è ancora chiarito. Si deve però trattare oltre che di effetto diretto anche di effetto indiretto.

Tra le altre preparazioni o combinazioni di Tripaflavina hanno acquistato importanza clinica la Panflavina, l'Argo-flavina (Tripaflavina e argento), la Coleflavina (Tripaflavina, estratto di belladonna, podofillina, olio di menta pip.) ecc.

Oltre alla Tripaflavina ha avuto particolare considerazione come antisettico chemioterapico il Rivanolo ⁽¹⁾.

(1) Il più recente chemioterapico della serie acridinica, l'Atebrin ottenuta da *Mietzsch* e *Nauss*, data la sua particolare indicazione (malaria), viene trattato in altra parte.

Questo preparato (ottenuto da *Roser* e *Jensch*) che fu sperimentato assieme a gran numero di altri preparati acridinici nei laboratori di Hoechst, da *Morgenroth*, *Schnitzer* e collaboratori ha la formula



2-etossi-6,9-diamminoacridina
(usato in terapia come lattato)

(X)

È caratterizzato da un'azione in profondità particolarmente spiccata, da una minima azione irritante locale e da un energico potere battericida. Per applicazioni locali esso è da taluni medici preferito alla Tripaflavina, soprattutto perchè meno colorante. In clinica la più importante indicazione di esso è risultata essere la dissenteria amebica; tra i prodotti sintetici che hanno risposto particolarmente bene nella terapia della dissenteria amebica, il Rivanolo va ricordato in prima linea accanto allo Yatren 105 (7-jodo-8-ossichinolin-5-sulfonato sodico) e allo Spirocid (acido 4-ossi-3-acetilamminofenilarsinico). Secondo le ricerche di *Wagner*, *Schaumann*, *Peter* e *Urchs* è assai bene tollerato per os alle dosi singole di 30-50 mgr., agisce tanto sulle forme vegetative quanto su quelle permanenti della dissenteria amebica e addimosta, oltre a proprietà parassitotrope, anche proprietà spasmolitiche e anestesiche, il che ha grande importanza in questa malattia.

Le sistematiche ricerche nel campo della 9-amminoacridina, eseguite nei laboratori di Hoechst, hanno dato ulteriori importanti risultati teorici e pratici.

Sia ricordato che certi nitroderivati di questo gruppo addimostrano un'azione battericida straordinariamente elevata, in particolare verso gli streptococchi emolitici (*Schnitzer*). Tutti

questi composti derivano dalla 6 - nitro - 9 amminoacridina. Una combinazione di un tale preparato col Rivanolo è stata introdotta nella pratica veterinaria col nome di Entozon, come specifico degli streptococchi dei bovini. I risultati sono particolarmente buoni.

Le ricerche nel campo del gruppo del Rivanolo, con che intendiamo designare le 9 - amminoacridine, sono ancora in pieno sviluppo.

Se prendiamo in considerazione l'attuale campo di indicazioni della Tripaflavina e di altri acridinici, dobbiamo rilevare che lo scopo principale, quello di trovare nella serie acridinica un buon rimedio della malattia del sonno, non è stato ottenuto, ma che tuttavia questi studi sono stati fruttiferi in un'altra direzione.

La norma di *Ehrlich*: « Il chemioterapista deve imparare a ottenere lo scopo per via chimica », non è qui stata fortunata. Ci eravamo proposti di combattere i tripanosomi, e invece questi li abbiamo soltanto sfiorati, mentre abbiamo colpiti i batteri. Al chemioterapista capita talvolta quello che capita alla giovane sposa, che, richiesta dal marito mentre ella sta in cucina, che cosa stia cuocendo, deve rispondere: « Lo saprò soltanto quando il manicaretto sarà pronto ».

Costituzione chimica ed effetto dei medicamenti

PROF. DR. MED. DR. PHIL. W. SCHULEMANN

Wuppertal - Elberfeld.

Su base empirica, ossia su basi intuitive coadiuvate dall'osservazione attenta della natura, gli uomini hanno scoperto già da tempi immemorabili tra i tesori offerti dalla natura i primi medicamenti. L'ulteriore sviluppo di essi fece poi progressi lenti, finchè nel corso del secolo XIX lo stato delle cognizioni fu tale da permettere in larga misura la sintesi di rimedi. Assai grande è attualmente il numero dei rimedi ottenuti sinteticamente e usati in pratica, ancora più grande quello dei composti preparati e sperimentati rispetto alla loro azione.

Basandosi su questo largo materiale di dati di fatto, si è sempre cercato di trovare rapporti tra costituzione chimica ed effetto, onde, procedendo ora su nozioni scientifiche, poter fare progressi ulteriori e rapidi.

Per lungo tempo si credette che dovessero esistere rapporti diretti tra costituzione chimica ed effetto. E per alcuni campi questi rapporti sembrarono esistere effettivamente. Rammentiamo ad es. gli eteri dell'acido benzoico, che tutti quale più e quale meno, hanno azione anestetica locale, e le proprietà antipiretiche del gruppo pirazolone. Ma la più attenta osservazione dimostra che ci sono anche molti composti dotati d'azione anestetica locale, i quali non sono eteri dell'acido benzoico, ad es. i derivati del feniluretano, della serie fenolica e arilalcolica ecc. Azione antipiretica hanno non soltanto i derivati del pirazolone, ma anche la chinina, molti composti della chinolina, derivati dell'anilina, dell'acido salicilico ecc.

Di fronte a questi fatti appare a prima vista impossibile di trovare rapporti di parentela tra la costituzione chimica di com-

posti di struttura così diversa, rapporti che potrebbero spiegare la stessa azione biologica.

Ma i lavori degli ultimi decenni hanno dimostrato quale importanza abbiano per il comportamento biologico le proprietà fisiche o fisico-chimiche.

Nella serie degli ipnotici e dei narcotici è apparsa ed è rimasta fondamentale la teoria dei lipoidi enunciata nel 1899-1901 da *H. H. Meyer* e *Overton*. Essa dimostrò che per la ripartizione quantitativa e per l'azione di una sostanza solubile nei lipoidi è di valore decisivo, accanto a una sufficiente solubilità in acqua, il rapporto delle sue due affinità di soluzione verso i lipoidi e l'acqua, ossia il quoziente $\frac{\text{Solubilità nei lipoidi}}{\text{Solubilità in acqua}}$ (*H. H. Meyer* in «*Experim. Pharmakologie*» di Meyer-Gottlieb, 7^a Edizione 1925, pag. 132).

La teoria dei lipoidi vede dunque in determinate proprietà fisico-chimiche la causa fondamentale comune per gli effetti ipnotico-narcotici di composti di struttura chimica così eterogenea, come ad es. il protossido di azoto, l'acetilene, il clorofornio, l'alcool, le amidi sostituite (Neuronale, Adalina), i derivati dell'idantoina, dell'acido barbiturico ecc.

La modificazione entro certi confini della struttura chimica - la contemporanea solubilità nei lipoidi e nell'acqua non deve mai andare del tutto perduta - porta per quanto per vie differentissime a composti con azione ipnotica o narcotica simile, se pure quantitativamente e qualitativamente assai variabile.

Degli effetti farmacologicamente e chemioterapicamente simili di altri composti di struttura tra loro diversa si cercò la spiegazione in altri campi.

Già nel 1885 *Ehrlich* nel suo «*Studio analitico sui colori*» aveva mostrato «il fabbisogno di ossigeno dell'organismo», quale influenza possa avere sulla ripartizione e l'effetto d'una sostanza la «granulazione» (*Körnung*) di essa, e come «le membrane di confine» possano adattarsi alle modificazioni della «granulazione». Cambiando le parole: si vede che *Ehrlich* già al-

lora aveva richiamato l'attenzione sulla influenza decisiva che il grado di dispersione di una sostanza e le modificazioni funzionali della permeabilità cellulare hanno sulla ripartizione delle sostanze.

Ma poi *Ehrlich* stesso, con la sua teoria delle catene laterali pose transitoriamente in secondo piano la concezione fisica in favore di quella puramente chimica (azione di gruppi atomici specifici, capaci di reazione).

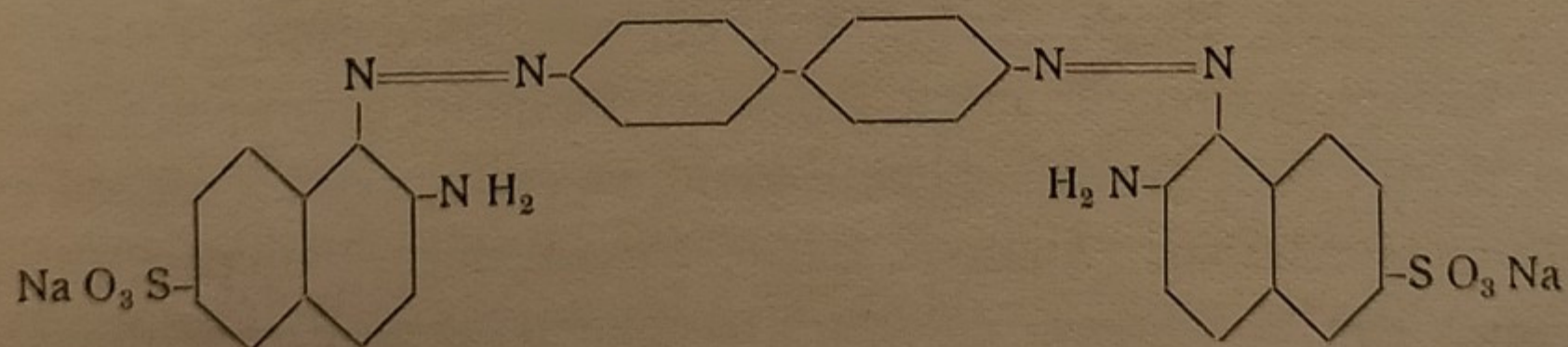
I progressi della chimica fisica fecero rapidamente conoscere nuove leggi. Una lunga serie di lavori venne a dimostrare negli anni successivi l'importanza biologica dei fenomeni delle superfici di confine, dello stato di soluzione ecc.

Evans e *Schulemann* poterono dimostrare per le sostanze coloranti acide e per molti colloidi che in essi non esistono rapporti diretti tra costituzione chimica e comportamento biologico.

Di importanza decisiva per la ripartizione di queste sostanze nell'organismo animale è il comportamento fisico-chimico delle loro soluzioni; per la loro fissazione d'un lato la carica elettrica e dall'altro lato lo stato funzionale di determinate cellule dell'organismo. Le loro proprietà fisico-chimiche sono in rapporto con la grandezza molecolare e con la costituzione chimica di un composto; e dalle proprietà fisico-chimiche dipende a sua volta il modo di comportarsi nell'organismo.

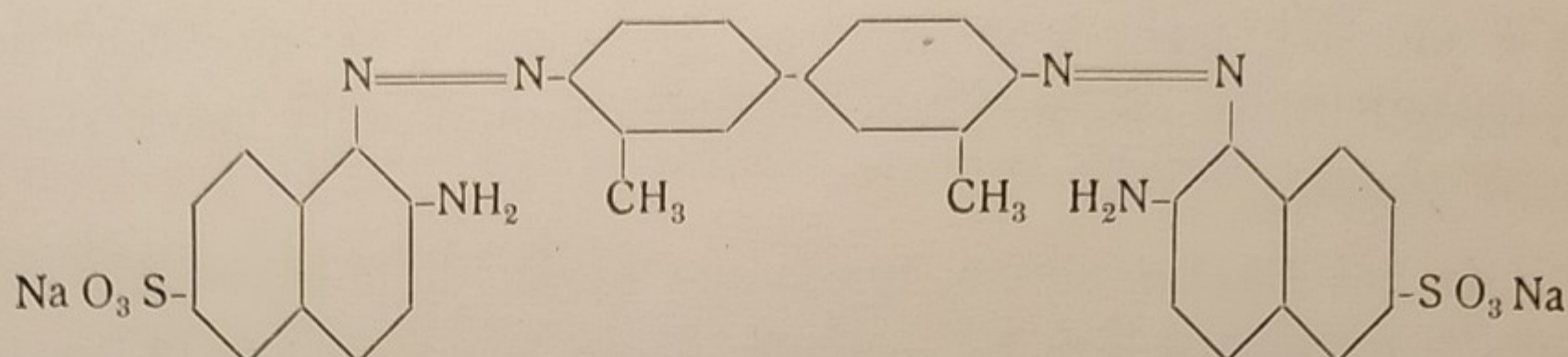
Con ciò diventa anche comprensibile come dei gruppi apparentemente così indifferenti, come i radicali alchilici, possano provocare modificazioni fondamentali del comportamento biologico.

Così ad es. il composto



è insolubile in acqua, senza alcun valore come colorante tessile e nell'organismo animale resta nel luogo dove è iniettato, men-

tre il composto omologo con la sostituzione di due gruppi CH_3



è un buon colorante del cotone e nell'organismo animale è un buon colorante vitale.

Lo spostamento del gruppo SO_3Na in questa sostanza colorante da C_6 a C_5 dà a sua volta un composto che al pari del suddetto è utilizzabile in ogni applicazione.

Differenze simili, qui nel senso terapeutico, troviamo nei composti della serie della Germanin (Bayer 205), che nelle loro proprietà fisico-chimiche sono prossimi ai coloranti acidi (*Roehl*, Arch. f. Schiffs-und Tropenkr., Vol. 30, fasc. I, pag. 103, 1926). Mentre la Germanin ha un indice terapeutico assai elevato (1:360), questo indice scende, ad es. togliendo soltanto un gruppo CH_3 dal gruppo a ponte, sotto a 1:10 (*Fischl e Schlossberger*, Handb. d. Chemotherapie, Vol. I, pag. 343 e segg., 1932).

Ma non soltanto le modificazioni della grandezza e della struttura molecolare sono di importanza decisiva per le proprietà biologiche di un composto. Di grande influenza sono anche le condizioni nelle quali il composto agisce. Concentrazione, epoca di preparazione, temperatura delle soluzioni, contenuto in elettroliti, colloidali ecc., possono influire grandemente sulle proprietà fisico-chimiche e con ciò biologiche di una sostanza, senza che ne segua una modificazione della struttura stessa della molecola (*Schulemann*, Bioch. Zschr., Vol. 80, pag. 38 e segg. 1917).

La spiegazione di molti fenomeni biologici e terapeutici, ad es. degli effetti di varie combinazioni, va cercata qui. Così, ad es. *Herzfeld* riferisce (Anatom. Hefte, I parte, fasc. 164, pag. 451 e segg.) che le sostanze coloranti basiche possono essere deviate dai luoghi altrimenti abituali di ripartizione mediante la previa iniezione di sostanze coloranti acide. *R. Keller* e i suoi colla-

boratori (confr. *R. Keller* « Die Elektrizität in der Zelle » III Edizione 1932) poterono dimostrare quale importanza abbia la carica elettrica di particelle di sostanza per la ripartizione e la deposizione; v. *Jancsó* (*Z. exp. Med.*, Vol. 34, pag. 256, 1929) dimostrò che con la irrorazione di fegato sopravvivate gli ultramicro e submicro di soluzioni metalliche colloidali vengono immagazzinati in forma granulare soltanto se alle soluzioni di metalli colloidali sono aggiunti siero di sangue o una soluzione di gelatina o di albume d'uovo. Queste e molte altre ricerche dimostrano di quale importanza è e possa essere il « mezzo » nel quale una sostanza agisce, tanto se si tratti di una sostanza alimentare quanto di un medicamento.

Ma di un terzo fattore si deve tener conto; lo stato funzionale di tutto l'organismo o dell'organo particolare o della cellula dell'organismo o del parassita sui quali la sostanza agisce.

Così dicasi ad es. per il fatto rivelato da *Reid Hunt*, che degli animali il cui ricambio è aumentato per aumento delle sostanze attive della glandola tiroide, diventano particolarmente insensibili verso l'avvelenamento da acetonitrile. *Weese e Weilguny* (*Verh. deuts. Pharmak. Ges.*, 1932, pag. 89) dimostrarono che gli animali a sangue caldo in istato febbrile tollerano dosi maggiori di glucosidi della digitale degli animali normali. Le sostanze stimolanti centrali addimostrarono a parità di dosi effetti più o meno spiccati corrispondentemente allo stato di eccitazione del sistema nervoso. L'intensità dell'effetto di veleni del vago e del simpatico dipende dal « tono » nel quale si trova il sistema nervoso autonomo.

R. Freund (*Virchows Arch.* Vol. 286, pag. 526, 1932) mostrò con l'esempio del fegato che il grado della irrorazione di un organo può essere un elemento determinante per il tipo ed il grado della deposizione di sostanze estranee. Però per alcune delle sue ricerche non sembra possa escludersi la interpretazione, che per il trattamento preliminare si sia avuta anche una influenza diretta sullo stato funzionale delle cellule riceventi.

Certo che le cellule stesse non si comportano affatto passivamente di fronte alle sostanze agenti. La loro struttura può essere a priori tale, che certe sostanze in condizioni normali nè vengono assorbite alle loro superficie di confine, nè pene-

trano in esse; ad es. le sostanze coloranti acide nelle cellule nervose. Ma entro certi limiti le cellule possono modificare il loro stato funzionale, sia per fenomeni fisiologici, sia per influenze esterne, e divenire più sensibili o più resistenti verso le sostanze che in esse giungono.

Nel modo più chiaro questo fatto delle modificazioni funzionali risulta nella resistenza opposta dai parassiti ai medicamenti, scoperta nel 1907 da *Franke* e *Roehl* (confr. *Ehrlich*, Berl. Kl. Woch., 1907, n. 11, pag. 310).

Ehrlich ha sospettato che la resistenza che i tripanosomi acquisiscono di fronte ai medicamenti abbia la sua causa in una diminuzione dell'avidità di chemocettori specifici. *Warrington York*, *Murgatroyd* e *Hawking* (Studies in Chemoterapy, Ann. of. trop. medic. and parasitology, 1931, pag. 351) hanno dimostrato sperimentalmente che questa diminuzione di avidità è causata da una diminuzione della permeabilità per i composti arsenicali; v. *Jancsó* (Z. f. Bakteriolog., 1931, pag. 129, 1932, pag. 167), dimostrò del pari con altri metodi e per altre sostanze della serie acridinica, pironinica, e stirilchinolinica, che la resistenza ai medicamenti dei tripanosomi del nagana dipende da una impermeabilità artificialmente provocata della cellula del parassita, ossia da una modificazione funzionale. Non erreremo ammettendo che anche l'effetto di molti ormoni e vitamine, che in quantità così straordinariamente piccole hanno un'influenza profonda sul ricambio di singoli organi o sistemi cellulari, non possa trovare altra spiegazione all'infuori di questa: che essi provocano modificazioni funzionali nelle cellule o nei sistemi cellulari.

Riassumendo possiamo oggi affermare, che non sembra esistano rapporti diretti tra costituzione chimica e comportamento biologico.

Le proprietà fisico-chimiche di una sostanza sono in rapporto con la grandezza molecolare e con la costituzione; esse determinano la ripartizione e la deposizione, e con ciò anche l'effetto di composti; così diviene comprensibile come composti si-

mili per costituzione chimica si possano comportare biologicamente in modo del tutto diverso e viceversa come composti di struttura del tutto differente possano comportarsi in modo simile, secondo la variazione delle proprietà fisico-chimiche inerenti alla modificazione della costituzione chimica. Ma il comportamento biologico di una sostanza viene variato non soltanto dalla costituzione chimica e con ciò dalle proprietà fisico-chimiche, ma anche, senza modificazioni della struttura molecolare, dalle influenze del « mezzo » sulle proprietà fisico-chimiche.

Come terzo fattore ha importanza lo stato funzionale dell'organismo, dell'organo o della cellula stessa, sui quali una sostanza agisce, sia che lo stato funzionale si modifichi o venga modificato attivamente o passivamente.

Ma per una interpretazione dell'azione delle sostanze accumulate alle superfici di confine delle cellule o penetrate nel protoplasma o nel nucleo mancano ancora quasi tutti i dati di repere. In molti casi dobbiamo sospettare che tali effetti debbano essere riferiti a reazioni chimiche, specialmente quando le sostanze vengono modificate nel ricambio interno.

Allo stato attuale delle indagini sembra bensì possibile di considerare il problema « Costituzione ed effetto » da punti di vista più uniformi e con ciò di avere nuove direttive per indagini ulteriori, ma le nostre cognizioni presentano ancora molte lacune e molto lavoro c'è ancora da fare per meglio chiarire la situazione. Ancora oggi non possiamo liberarci da un tipo di lavoro empirico, tanto più che le nostre cognizioni sui rapporti tra costituzione chimica e proprietà fisiche sono ancora assai limitate.

Metodi e scopi degli studi sulle vitamine

PROF. DR. FRITZ LAQUER

Dall' Istituto Fisiologico della I. G. Farbenindustrie A. G.,

Werk Elberfeld

A. Le vitamine e gli ormoni sono sostanze dello stesso tipo?

Tra le sostanze anche terapeuticamente importanti, che la moderna chimica fisiologica ci ha rese accessibili, le vitamine e gli ormoni hanno un posto a sè. Spesso essi vengono citati assieme, il che presuppone implicitamente la concezione che siano nella loro essenza strettamente affini. Tuttavia, per quanto ne sappiamo, per proprietà chimiche sono fundamentalmente diversi. Già ogni singola vitamina, tra quelle finora note, appartiene ad un'altra classe di sostanze, e lo stesso vale per gli ormoni. Ma anche rispetto al loro comportamento biologico, al loro presunto « punto di attacco » nell'organismo, non esistono rapporti tra questi due gruppi di sostanze biologicamente attive. Si è da taluni ritenuto che le vitamine introdotte con l'alimentazione siano le sostanze fondamentali dalle quali l'organismo forma i propri ormoni. Questa idea appare a prima vista lusinghiera, ma non ne fu mai data una dimostrazione sperimentale. Soltanto tra la vitamina antirachitica e l'ormone delle paratiroidi sembrano esistere rapporti un po' più stretti, che per altro hanno bisogno di una più precisa chiarificazione; altrettanto dicasi dei presunti rapporti tra acido esuronico, agente come la Vitamina C, e la corteccia dei surreni, nella quale esso fu del pari dimostrato, nonchè di quelli assai vaghi tra Vitamina E e ormoni sessuali.

Ma ad onta di ciò esistono importanti punti di connessione che dalle Vitamine vanno agli ormoni. Si tratta per entrambi di sostanze che pure agendo in quantità piccolissime sono im-

portanti o necessarie per lo svolgimento normale della vita. Esse vengono dimostrate dalle influenze che esercitano, o ancora più spesso dalle conseguenze della loro mancanza, le così dette «malattie da carenza o fenomeni di deficit». Di conseguenza, finchè della loro natura chimica nulla o assai poco si sappia, possono essere riconosciute e determinate non coi metodi chimici abituali, bensì per via biologica. La possibilità della loro misurazione quantitativa, il così detto «test», è di pari importanza tanto per le vitamine quanto per gli ormoni, non soltanto per lo studio di essi, ma anche per un'applicazione terapeutica scientificamente fondata.

Trattando in quanto segue brevemente delle basi generali che sono necessarie per studi fruttiferi in questo campo, rinunzio ai riferimenti della letteratura, perchè una esposizione esauriente dei lavori pubblicati in questo campo oltrepasserebbe i limiti di qualsiasi esposizione. Mi limiterò pertanto a riferire alcune delle constatazioni fatte in questi ultimi anni in un grande laboratorio.

B. Gli studi sulle Vitamine

I. Basi fondamentali

La scoperta delle vitamine e degli ormoni è dovuta per lo più a medici, che hanno intuito i rapporti esistenti tra un quadro clinico descritto da essi stessi per la prima volta e la mancanza di sostanze di importanza vitale. Ma lo studio ulteriore di queste sostanze formate nell'organismo stesso o apportate con l'alimentazione diviene possibile soltanto se si riesce a provocare negli animali le stesse malattie o almeno malattie assai simili. Ma tanto le malattie da carenza che si sviluppano quando si tolgano le vitamine, quanto i fenomeni di deficit presentati dagli animali quando manchino degli ormoni, possono essere utilizzati soltanto quando sono passibili di un procedimento quantitativo. Le serie di ricerche a ciò necessarie richiedono un gran nu-

mero di piccoli animali da Laboratorio - si usano per lo più ratti, topi o cavie - e una organizzazione corrispondente. Specialmente se devono essere studiati in uno stesso luogo parecchie vitamine e ormoni le une accanto agli altri, è assolutamente necessario di avere un allevamento proprio di animali che assicuri un materiale uniforme e sano. Inoltre non devono mancare gli altri sussidi che sono necessari per sorvegliare migliaia di animali.

Quando non si hanno a disposizione le installazioni necessarie, non si deve assumere lo studio di questi problemi. Molti errori e molte contraddizioni sarebbero evitati nella letteratura sugli ormoni e sulle vitamine se si pubblicassero soltanto quei risultati che sono stati ottenuti in un numero sufficientemente grande di animali. È ad esempio risultato che una esatta determinazione del valore di preparati di vitamina A e D richiede dieci ratti per ogni dose. Per la valutazione dell'ormone del lobo anteriore della ipofisi Prolan bastano in genere cinque giovani ratti femmine per ogni singola somministrazione giornaliera. Un numero minore di animali è permesso soltanto per le ricerche di orientamento quando si voglia avere una idea approssimativa dell'efficacia biologica. Per ogni esatta standardizzazione un buon test richiede il trattamento di almeno cinque animali colla stessa dose.

Ma anche così facendo, i risultati sono spesso notevolmente differenti in vari periodi. Queste oscillazioni della sensibilità da taluno denominate «stagionali», spesso sono assai difficilmente spiegabili. Per la valutazione del Vigantolo abbiamo alimentato una volta per tutto un anno tutti gli animali con la stessa miscela alimentare. Tuttavia non poterono essere evitate certe differenze. Di conseguenza per le valutazioni importanti è necessario di usare contemporaneamente un «preparato standard», in base al quale si possano riconoscere le modificazioni nel «livello» di tutta la ricerca. Un chimico che è abituato a pesare le sue sostanze fino alle cifre oltre i quattro zeri, si a-

datta difficilmente ad una esattezza che anche nei casi più favorevoli di rado va oltre il 25% in più o in meno. Ma d'altra parte molti test sono assai più sensibili della migliore bilancia analitica. Per dare un solo esempio, nella valutazione della vitamina antirachitica mediante prova biologica sui ratti, γ 0,01 ($1 \gamma = 1/1000$ mg.) sono ancora ben riconosciuti e determinati.

Si è cercato di giudicare queste valutazioni statistiche secondo le regole della dottrina della probabilità e con ciò si è in certi casi ottenuta una maggiore precisione di risultati.

Ma il risultato più importante era già prima acquisito ed è, espresso in forma del tutto non matematica, che ogni standardizzazione è tanto più esatta quanto maggiore è il numero degli animali che si usano.

Le esperienze sugli animali non sono fine a se stesse. Sono purtroppo un mezzo molto complicato e costoso per raggiungere lo scopo finale, quello di ottenere le sostanze attive in forma pura. Talvolta vi sono oltre ai procedimenti biologici anche metodi chimici, ad es. reazioni coloranti, per la dimostrazione delle sostanze ricercate. Ciò facilita e accelera la preparazione allo stato puro. Non è certo per semplice caso che l'adrenalina e la tirossina, che si possono dimostrare con mezzi chimici anche a forte diluizione, furono i primi ormoni isolati come sostanze pure e poi ottenuti anche per via sintetica.

Ma anche se la preparazione allo stato di purezza di ormoni e vitamine permette di abbandonare la titolazione di preparati in base a unità biologiche e di passare alla posologia in peso, per molte ricerche non si può ancora fare a meno della prova biologica, specialmente quando si tratta di preparati assai diluiti o cui sono state fatte aggiunte di qualche genere.

Esponendo in quanto segue a grandi tratti, lasciando da parte molte importanti particolarità, fino a qual punto siano giunte le indagini in questo campo, intendiamo di limitare alle vitamine le nostre considerazioni. Per altro le condizioni sono affatto simili, dal punto di vista della metodica, per gli ormoni.

II. - *Stato attuale degli studi sulle vitamine*

1) VITAMINA A

Per la Vitamina A abbiamo un ben elaborato metodo di dimostrazione nei ratti giovani, il cui sviluppo si arresta dopo poche settimane se vengono alimentati con una dieta senza vitamina A. Gli animali finiscono col morire, dopo avere spesso presentato xeroftalmia. Molto ricco in vitamina A è l'olio di fegato di merluzzo, da gran tempo noto ed usato. La dose giornaliera minima, che nelle condizioni abituali di esperimento ripristina lo sviluppo pieno di ratti il cui peso si era arrestato, è di circa 2-4 mgr. di olio di fegato di merluzzo. Di un buon burro ce ne vuole una quantità 100-200 volte superiore.

La colorazione in turchino (metodo colorimetrico) di tutti i preparati contenenti vitamina A, quando siano trattati con una soluzione di tricloruro di antimonio in cloroformio, dà pure buoni elementi per giudicare del contenuto in vitamina A, per quanto questa reazione colorante non sia strettamente specifica. Si è riusciti ad ottenere dall'olio di fegato di merluzzo con relativa rapidità, mediante procedimenti di arricchimento che sono applicabili anche nelle preparazioni in grande, delle frazioni contenenti vitamina A, nelle quali una unità ratto è già contenuta in 1 γ . Ciò comporta un rafforzamento di effetto di circa 2-4000 volte rispetto all'olio di fegato di merluzzo.

La Carotina, che forma bei cristalli, è pure efficace nelle esperienze sui ratti, nelle stesse proporzioni. Essa non è però, secondo l'opinione generale, la Vitamina vera e propria, bensì, viene trasformata in vitamina A nell'organismo, molto probabilmente nel fegato; la vitamina A deve quindi essere chimicamente assai affine alla Carotina. Si può ammettere che tra non molto tempo se ne otterrà la preparazione allo stato di purezza. La determinazione della costituzione dirà poi se sia attualmente possibile e praticamente vantaggiosa la sintesi della vitamina A; ciò appare poco verosimile.

Per quanto non sia ancora stabilito se la seconda vitamina liposolubile che è presente nell'olio di fegato di merluzzo sia identica alla vitamina antirachitica che si ottiene colla irradiazione ultravioletta dell'ergosterina, pure non esiste alcun dubbio che l'ergosterina irradiata è in grado, in dosi straordinariamente piccole, di evitare e di far guarire la rachitide non soltanto negli esperimenti sugli animali ma anche nell'uomo malato. Quando, basandosi su di un metodo di determinazione sicuro e in seguito ancor meglio perfezionato, si trovò nei giovani ratti che coll'irradiazione dell'ergosterina hanno origine dei preparati, i quali nelle esperienze sugli animali sono già attivi alle dosi di circa 0,10 γ , preparati che poi poterono essere ottenuti in grande e usati a scopo terapeutico, si credette che si sarebbe ben presto riusciti a ottenere la vitamina antirachitica in forma pura, cristallina. Invece, ad onta degli studi di chimici di vaglia, sono occorsi parecchi anni prima che dalla miscela prodottasi coll'irradiazione dell'Ergosterina si siano potuti separare e ottenere in forma cristallina dapprima la vitamina antirachitica pura e poco dopo una serie di altri prodotti di trasformazione. Si è quindi spesso sorpresi di vedere con quanta leggerezza si parli in pubblicazioni scientifiche della preparazione allo stato di purezza di sostanze biologicamente attive, le quali presentano condizioni di ricerca di gran lunga più sfavorevoli che non la ergosterina cristallizzata irradiata in solventi puri dei grassi e suoi prodotti di trasformazione; le affermazioni di cui sopra non resistono poi, naturalmente, alla critica.

Altrettanto sorprendenti sono le affermazioni che esisterebbero preparati amorfi ancora più efficaci della Vitamina D cristallizzata; opinioni basate sui risultati di esperienze comparative sugli animali fatte in luoghi del tutto differenti, in epoche del tutto differenti e spesso anche con metodi tutto affatto diversi. Come si è già ricordato, tali esperimenti sono degni di fiducia soltanto quando si basano su un materiale assai nume-

roso; ma soprattutto i preparati da confrontare, in questo caso la Vitamina D e il prodotto non cristallizzato presunto più efficace, devono essere confrontati nella stessa esperienza uno accanto all'altro. Quando così non è, tutte le affermazioni relative a preparati antirachitici amorfi, di presunta maggiore efficacia, non hanno alcun valore.

Si legge spesso, che oltre all'olio di fegato di merluzzo, nel quale secondo le nostre ricerche una Unità ratto è contenuta in circa 10 - 20 mgr. (esso contiene quindi soltanto circa la 500000 parte di fattore antirachitico della Vitamina D pura) anche il burro e le uova avrebbero azione antirachitica. Noi abbiamo recentemente, con esperienze in ratti, determinato il contenuto in Vitamina D di un burro usuale e abbiamo trovato, che anche 1 gr. al giorno non esplica ancora alcuna azione. Nel burro è dunque contenuto meno del 0,000002 % di Vitamina D pura. Esso è almeno 100 volte inferiore per proprietà antirachitica, all'olio di fegato di merluzzo. Per evitare e far guarire la rachitide in un bambino, si dovrebbe dare, presupposto che nel burro sia in genere dimostrabile la Vitamina D, più di Kg. 1,5 al giorno. Da questo esempio si vede quale conto si possa fare dei dati riferentisi alla ricchezza in Vitamina degli alimenti. Le cifre esatte sono e devono essere anche qui le basi fondamentali delle affermazioni scientifiche.

Anche un altro quesito, che per lungo tempo rimase insoluto, poté essere chiarito soltanto col sussidio di ricerche precise fatte negli animali. Poco dopo la scoperta dell'ergosterina irradiata si era constatato che i prodotti dell'irradiazione ad alte dosi sono tossici. Essi provocano tra altro calcificazioni caratteristiche, che alla fine possono provocare la morte degli animali. Siccome per lungo tempo non si seppe se questi effetti accessori provocati da iperdosaggio fossero dovuti alla vitamina antirachitica stessa o non piuttosto a prodotti accessori inevitabili, forse anche evitabili, per il fattore provocante tutto il complesso sintomatico, si scelse la denominazione di «fattore di

calcinosi ». Anche questo elemento calcificante può essere determinato quantitativamente nelle esperienze sugli animali, al quale riguardo si prestano soprattutto i topi.

Una unità topo oscilla, secondo le condizioni dell'esperimento e la purezza del preparato, tra 0,05 e 0,30 mgr. Già dal fatto, che la già citata unità ratto viene espressa in γ ($1/1000$ di mgr.) e invece il fattore di calcinosi appartiene ad una unità di peso 1000 volte maggiore, si riconosce quanto grande deve essere l'iperdosaggio perchè dei preparati antirachitici possano divenire tossici. Come per altri farmaci, si è anche qui stabilito il rapporto tra dose curativa e dose dannosa, il così detto indice terapeutico; esso oscilla per i preparati di ergosterina normalmente irradiati tra le cifre di 1:2000 e 1:5000.

Già da lungo tempo si riteneva di potere mediante speciali condizioni di irradiazione, soprattutto mediante esclusione di determinate lunghezze d'onda ottenute con filtri appropriati, avere dei preparati che fossero soltanto antirachitici e non fossero tossici neppure ad alte dosi.

Questa convinzione era basata, come potè essere poi dimostrato, sul fatto, che non si erano titolati quantitativamente con sufficiente attenzione su un materiale animale appropriato tanto l'efficacia quanto la tossicità. Il vero si è, che il rapporto tra efficacia e tossicità dei preparati di ergosterina irradiata è indipendente dalla lunghezza d'onda della sorgente luminosa usata per l'attivazione. Quando circa un anno fa si riescì ad isolare in forma cristallina dal miscuglio di ergosterina irradiata la vitamina pura antirachitica, si constatò in pari tempo che anche questi preparati ad alte dosi sono calcificanti e tossici. In circa 1000 ratti e 300 topi noi abbiamo determinato col solito metodo le cifre limite e le abbiamo trovate di 0,02 γ e rispettivamente 0,06 mgr. L'indice terapeutico si muove dunque nella stessa ampiezza (1:3000), che con le miscele gregge finora usate. Ma con ciò si era raggiunto il limite delle possibilità metodiche delle esperienze sugli animali.

In primo luogo le cifre medie suddette valgono soltanto per il materiale animale e le altre condizioni di esperimento di un determinato Laboratorio. Le cifre ottenute in altre sedi possono essere notevolmente diverse. Ma soprattutto la sensibilità dei metodi non permette più di dimostrare una differenza tra la miscela greggia irradiata e la Vitamina D pura, se durante la irradiazione della ergosterina si producono sostanze che sono soltanto tossiche senza avere efficacia antirachitica, ma non sempre si producono in quantità tali da poter essere rilevate entro le oscillazioni inevitabili delle esperienze sugli animali, specialmente se si appalesano, come per la valutazione dell'indice terapeutico, in due valutazioni differenti.

Già da molto tempo era stato dimostrato che si riesce effettivamente, ad es. irradiando eccessivamente la ergosterina, ad ottenere delle sostanze che hanno ancora effetto calcificante, ma non più antirachitico. Orbene, queste sostanze si producono anche nella irradiazione normale ultravioletta della ergosterina? Questo quesito può essere, come già si disse, risolto soltanto con lo studio chimico della miscela da irradiare e la preparazione allo stato di purezza delle varie sostanze, che si producono tanto nello svolgimento della trasformazione dell'ergosterina in Vitamina antirachitica, quanto per ulteriore irradiazione della Vitamina D già formatasi. Si è potuto dimostrare che tanto nel passaggio dell'ergosterina alla Vitamina D, quanto con la irradiazione normale si producono sostanze tossiche, che non hanno ancora o non hanno più efficacia antirachitica. Mentre la Vitamina D è il solo prodotto di irradiazione dell'ergosterina che abbia azione antirachitica, si producono accanto ad essa almeno due altri prodotti di trasformazione che sono tossici.

Questa constatazione ha una grande importanza pratica. Anche per l'uso terapeutico della Vitamina D si dovranno usare soltanto preparati cristallizzati, onde evitare in tal modo, che nelle miscele ottenute con la irradiazione siano contenute quantità incontrollabili di sostanze che sono soltanto tossiche.

3) VITAMINA E.

Finora non poterono essere constatate che poche particolarità della « Vitamina antisterilità », frazione liposolubile designata con la lettera E; essa è soprattutto abbondante nei germogli del frumento. Manca soprattutto un metodo esatto di determinazione quantitativa. Anche sulle sue proprietà chimiche si hanno dati scarsi, sicchè, non avendo neppure esperienza personale, vogliamo limitarci a questi brevi cenni.

4) IL GRUPPO VITAMINA B.

La Vitamina B, solubile in acqua, le cui proprietà antineuritiche, di prevenzione del beri-beri, sono note da lungo tempo e della quale anche si sapeva che esercita pure azione favorente lo sviluppo, non è sostanza unitaria. Si sono distinti nel gruppo della Vitamina B diversi fattori, che non hanno purtroppo avuto una denominazione unica, perchè soprattutto in Inghilterra furono numerate le varie vitamine di questo gruppo e si è parlato di Vitamina B₁, B₂, B₃ ecc.; in America i vari fattori furono denominati Vitamina B, G, F ecc.

Finchè non si sarà giunti in questo campo a sostanze chimicamente ben caratterizzate, riteniamo che la suddivisione migliore del gruppo della Vitamina B sia quella in cifre.

La Vitamina B antineuritica, come è noto da breve tempo, è un'ammina contenente zolfo, che nei suoi sali forma dei bei cristalli e che si può ottenere dalla crusca del riso e dal lievito. La sua formula bruta è verosimilmente C₁₂ H₁₆ N₄ OS. I procedimenti di preparazione sono però molto complicati e non danno neppure l'un per cento di tutto il fattore antineuritico contenuto nel lievito, quando si usino a titolo comparativo i risultati delle ricerche sugli animali. Le determinazioni del valore antineuritico nei colombi si possono fare molto bene. La quantità più piccola che in determinate condizioni guarisce in un giorno dei colombi gravemente malati di beri-beri, è una « unità colombo ». Essa è in media nel lievito fresco compresso pari a gr. 0,04.

Della sostanza cristallizzata, usata in forma di cloridrato, sono necessari in cifra tonda 2,5 γ. Nel lievito compresso umido delle birrerie è dunque presente circa il 0,006 ‰ di vitamina B₁. Tutte le altre sono sostanze di zavorra, che devono essere eliminate nella preparazione allo stato di purezza.

Le nostre nozioni sugli altri fattori B sono assai più scarse. Si è bensì elaborato per la vitamina dello sviluppo in senso stretto, detta per lo più B₂, un buon metodo di dimostrazione nei ratti in via di sviluppo; ma per lo sviluppo degli animali è pure necessaria la Vitamina B₁. In questa prova si devono dunque aggiungere estratti che contengono la Vitamina B₁ in forma quanto più possibile concentrata.

Ma secondo il grado di purezza di tali estratti si ottengono diversi effetti sullo sviluppo, il che in unione ad altre osservazioni ha fatto ritenere che per lo sviluppo corporeo siano necessari anche altri fattori, che sono stati denominati B₃, B₄ e B₅. Se sarà in avvenire possibile di usare per il saggio sui ratti della Vitamina B₂ un preparato B₁ puro, risulterà se sia necessaria una tale suddivisione in molti sottogruppi delle vitamine dello sviluppo, solubili in acqua. Infine è ancora del tutto incerto se la sostanza designata colle lettere PP, che previene la pellagra, se i fattori dello sviluppo R e Y, se la sostanza stimolante lo sviluppo dei fermenti e designata come «Bios», appartengano a questo gruppo e siano anche chimicamente affini. Ci vorrà molto tempo prima che tutto il complesso Vitamina B sia sviscerato e ottenuto in forma di sostanze chimicamente pure, ben definite.

5) VITAMINA C

Anche per la Vitamina C antiscorbutica abbiamo un test sicuro, da usarsi nelle cavie, test che ha permesso a numerosi autori con studi proseguiti per anni, di ottenere in forma concentrata, dai limoni, la Vitamina antiscorbutica e di desumere qualche nozione sulla natura chimica di essa. I primi dati sui

rapporti tra narcotina e questa vitamina non poterono essere confermati da numerosi osservatori; attualmente si studia se e quanto l'acido esuronico, che è presente nella corteccia surrenale, sia identico alla Vitamina C. In mancanza di esperienze personali un po' estese, non mi occupo qui in dettaglio di questo problema.

C. Applicazione ad altri problemi dei metodi usati per le Vitamine e per gli ormoni.

Come già si disse in principio, è risultato che anche per gli ormoni, come per le Vitamine, la loro preparazione allo stato puro dipende soprattutto dai progressi che si fanno negli oggetti di test. Ha inoltre importanza essenziale la natura chimica dei singoli ormoni. Sappiamo che alcuni di essi sono sostanze a peso molecolare elevato, prossime agli albuminoidi, derivate da amminoacidi, la cui analisi chimica presenta le stesse difficoltà che quella degli albuminoidi. Per alcuni ormoni, per es. quello del timo o dell'epifisi, manca ancora un test utilizzabile, sicchè il loro studio non potè finora essere fatto in modo conveniente. Si deve ammettere che il numero delle glandole a secrezione interna è limitato e che le più importanti di esse sono già attualmente note. Anche per le vitamine le probabilità di scoprire nuove classi di sostanze che meritino a buon diritto questo nome non sono assai grandi.

Si potrebbe pertanto, con un certo disappunto o con una certa soddisfazione secondo il punto di vista personale, vedere ben prossimo il giorno nel quale queste sostanze saranno state analizzate in modo completo, limitatamente allo stato attuale della scienza chimica. Ma la natura ha provveduto ad offrire anche qui nuovi campi di attività. Intanto nelle grandi glandole del corpo esistono sostanze ad azione specifica, che possono del pari far guarire delle malattie, ad es. la sostanza epatica che è efficace nell'anemia perniciosa, sostanza la quale non appartiene esatta-

mente nè agli ormoni nè alle vitamine. Ma soprattutto sappiamo da alcune ricerche molto recenti che tanto l'organismo animale quanto quello vegetale formano sostanze, che hanno pure compiti particolari da adempiere in quantità assai piccole. Ricordo le sostanze agenti sul circolo e l'auxin, sostanza dello sviluppo. Se si ammette che tutte o almeno una gran parte delle funzioni delle cellule viventi siano regolate o provocate da sostanze nettamente specifiche, lo studio futuro di queste ci offre un campo di attività di ampiezza per ora imprevedibile.

Lo sviluppo della dottrina dell'immunità

PROF. DR. R. BIELING

Dal Reparto Siero-batteriologico » *Bayer-Meister Lucius-Behringwerke* «

Hoechst - Marburg.

Quando le *Farbwerke vorm. Meister Lucius e Brüning*, al principio del 1890 iniziarono la produzione dei sieri e dei vaccini, esse unirono ai loro comparti tecnici un Laboratorio scientifico, sotto la direzione del fondatore della sieroterapia, *Emilio von Behring*. Questo Laboratorio aveva il compito di elaborare ulteriormente la dottrina, di recente formulata, della immunità, nonché di studiare metodi esatti di saggio per i sieri antitossici e con ciò di trovare i metodi migliori della immunizzazione pratica, onde poter preparare prodotti quanto più possibile efficaci. Già nel 1899 si giunse a risultati tali, che Behring poté con legittimo orgoglio usare una antitossina difterica con 1200 Unità per cc. Indi i metodi di preparazione si perfezionarono talmente che si possono offrire ora ai medici sieri antidifterici con 2000, 4000 e anche 5000 Unità per cc., e che per gli altri sieri (antitetanico, anaerobico, contro il botulismo, antidissenterico, contro il veleno delle vipere e degli scorpioni) si ottengono prodotti almeno 10-20 volte più attivi dei primi prodotti del genere.

Le ricerche scientifiche che resero possibili questi progressi tecnici acquistarono oltre a ciò un interesse teorico generale per la dottrina dell'immunità e poterono in questi ultimi anni essere utilizzate per la spiegazione della patogenesi di complessi sintomatici e di quadri morbosi.

Ricorderò qui sotto in forma riassuntiva i fatti constatati nei nostri Laboratori e le deduzioni relative.

I nostri lavori hanno avuto punto di partenza in una voluta trasformazione del modo di considerare le questioni e dei metodi di ricerca. In un momento nel quale i problemi delle difese contro le malattie e della produzione delle immunità e delle

reazioni immunitarie erano considerati come un fatto pato-fisiologico, non bastavano più le semplici formule di *Ehrlich*, che aveva riassunto tutti i processi di difesa dell'organismo in simboli di valore didattico. Mediante l'esame sistematico dei singoli processi che si riconnettono alla penetrazione dei germi morbosi o delle loro tossine nell'organismo sano, si poterono spiegare quei processi che hanno per effetto la distruzione dei germi morbosi e delle loro tossine e inoltre la produzione di quello stato particolare detto immunità per il quale nuove eventuali infezioni simili sono soppresse in germe od almeno portate rapidamente a guarigione.

L'importanza predominante del sistema cellulare reticolo-endoteliale (da *Aschoff* riconosciuto come unità funzionale) per la difesa contro i germi morbosi nel senso di renderli innocui e per la produzione della immunità, risultò sempre più evidente. Queste cellule in reciproco rapporto a mo' di reticolo mediante finissime propaggini rivestono gli spazi sanguigni dilatabili, in particolare anche quelli dei grandi organi addominali. Se dei germi morbosi o le loro tossine penetrano dall'esterno o da un focolaio morbo primario, localizzato nel circolo sanguigno, le « spugne di sangue » degli organi addominali, ad es. la polpa rossa della milza oppure gli spazi sanguigni situati a mo' di seni tra le trabecole delle cellule epatiche, si dilatano talmente che grandi quantità di sangue vengono ivi trattenute. Questa dilatazione del lume vasale causa naturalmente un rallentamento del circolo. Gli elementi corpuscolari estranei commisti al sangue si depositano, come sempre nella stasi vasale, alle pareti e vengono con ciò a trovarsi in diretto contatto con questi elementi cellulari reticolo-endoteliali che rivestono le pareti stesse. Costesti fagociti fissi sono di conseguenza in condizione di esercitare la loro attività fagocitaria e di liberare dagli inquinamenti batterici il sangue che circola lento dinnanzi ad essi. Le cellule parietali cariche di materiale estraneo, dopo che hanno assorbito i germi morbosi, vanno però distrutte. Queste cellule mar-

ginali dapprima snelle, si rigonfiano, si arrotondano, si staccano alla fine completamente, col carico che hanno assorbito e che frattanto si è più o meno alterato, dalla rete che le tratteneva e passano negli spazi sanguigni, che esse dapprima rivestivano. In forma di grosse cellule mononucleari e di istiociti esse circolano nel sangue coi batteri incorporati, resi innocui. Gli spazi vuoti da esse lasciati vengono però riempiti con grande rapidità da cellule giovani. In certi casi a questi fagociti fissi vengono anche in aiuto gli endoteli dei capillari e i leucociti liberi circolanti nel sangue.

Gli elementi cellulari, ricolmi di batteri e messi in circolo, vengono alla fine arrestati dai polmoni e quindi scissi.

Si possono seguire questi processi sotto al microscopio, si può anche seguire lo svolgimento dell'eliminazione dei batteri dall'organismo, determinando continuamente il contenuto in germi e in tossine del sangue circolante. Con ciò si ha un indice della normale funzione di eliminazione delle cellule delle pareti vasali. Se ora si diminuisce artificialmente di molto il numero delle cellule funzionanti mediante l'estirpazione della milza, ossia di un organo che è particolarmente ricco in queste cellule, e contemporaneamente si danneggiano le altre cellule reticolo - endoteliali dell'organismo con un veleno elettivo, il deficit di funzione che ne deriva dimostra la importanza delle cellule tolte od escluse mediante intossicazione.

Dobbiamo alle ricerche di *v. Jancsó* se possediamo oggi nel cuprocollargolo un preparato particolarmente adatto per queste ricerche; esso provoca un'offesa facilmente dimostrabile coll'esame istologico di quello che resta del sistema cellulare reticolo-endoteliale dopo estirpazione della milza.

Se poi si controlla continuamente il contenuto in germi del sangue di animali da esperimento così previamente trattati e poi infettati per via venosa, si vede che la eliminazione e la distruzione dei germi morbosi introdotti nel sangue si compie molto più lentamente; corrispondentemente si ha anche un ra-

pido aumento dei germi infettanti nel sangue, una precoce produzione di sepsi e la morte rapida degli animali.

Però non solo i germi morbosi stessi, ma anche le loro tossine vengono eliminate per il tramite dei reticolo-endoteli. Ciò si può dimostrare in modo uguale con la stessa tecnica, ad es. per la tossina tetanica, e da ciò si deduce che non soltanto elementi corpuscolari più grossolani, delle dimensioni dei batteri, ma anche sostanze estranee colloidali, quali sono le tossine al loro stato naturale, sono assorbite ed eliminate dallo stesso apparato cellulare. Con ciò riesce comprensibile che, come si può del pari dimostrare, delle sostanze che conosciamo quali prototipo dei virus filtrabili, ossia ad es. dei batteriofagi, possano essere eliminate dal sangue con lo stesso meccanismo di difesa.

Ma la funzione del sistema cellulare reticolo-endoteliale non è soltanto di importanza decisiva per la vittoria sul processo morboso acuto e per la eliminazione della sua causa provocante, ossia dei germi morbosi stessi più o meno grossi e delle loro tossine solubili. Dalla sua funzione dipende anche se la vittoria su una tale infezione dà luogo o no alla produzione della immunità naturale, ossia di una maggiore e più efficace facoltà di difesa contro una seconda infezione dello stesso genere. Tutti i nostri metodi artificiali di immunizzazione, la immunizzazione preventiva di soggetti sani con germi morbosi attenuati o con tossine modificate, non sono altro che infezioni dosate, che naturalmente vanno a risvegliare lo stesso apparato di difesa che la infezione naturale. Di conseguenza la produzione dei così detti anticorpi circolanti liberi nel sangue e che coadiuvano a produrre l'immunità è legata alla integrità del sistema cellulare reticolo-endoteliale normale e da essa dipendente.

Anche quando, allo scopo di ottenere una immunizzazione passiva, si introducono in un animale normale infettato gli anticorpi formati da un altro animale immunizzato attivamente, ossia quando si applica la sieroterapia, una parte dei processi di legatura e di difesa si svolge certamente nei reticolo-endoteli. La

immunità come proprietà di tutto l'organismo è dunque connessa a un tessuto cellulare diffuso per tutto l'organismo e ammassato in particolare nella milza e molto numeroso nel fegato. Esso è il portatore della immunità complessiva e con la sua collaborazione si producono i così detti anticorpi del siero, di importanza determinante per la immunità umorale.

La raggiunta immunità può poi a sua volta appalesarsi in questo modo, che dei germi morbosi penetrati in massa nella corrente sanguigna, ad es. quelli di natura batterica, vengono eliminati rapidamente e senza residui, e che avviene la guarigione perfetta. Ma anche con un grado minimo di immunità o con una virulenza particolarmente alta dello stipite infettante la sepsi può essere evitata, ma prodursi pur tuttavia l'insediamento di germi in singoli organi, ad es. i reni, sicchè in detti organi si sviluppano processi morbosi localizzati, circoscritti, i così detti focolai di eliminazione. Ma anche nella prima evenienza la eliminazione completa dei germi penetrati non è possibile senza modificazioni reattive nell'organismo, che sono per se stesse di natura aspecifica, ma devono la loro produzione all'azione del germe morbo e degli anticorpi specifici formati per la infezione antecedente.

Queste modificazioni reattive possono però anche, senza domare completamente la infezione, renderla di gran lunga più benigna e trasformare in modo del tutto caratteristico il quadro patologico e lo svolgimento di questa infezione nell'organismo previamente trattato, immunizzato. E' importante di conoscere queste modificazioni caratteristiche del decorso della infezione sotto l'influenza della immunità, perchè tali quadri clinici così modificati sono naturalmente di prognosi migliore riguardo alla guarigione di quelle infezioni che progrediscono senza essere arrestate nell'organismo non previamente trattato. Vogliamo illustrare questi due tipi con la scorta di due esempi.

Se si tratta un animale da esperimento, ad es. un cavallo, con batteri uccisi o anche con piccole quantità di batteri vi-

venti e poi si sale progressivamente con la quantità della massa iniettata, si produce una immunità fondamentale la quale è così spiccata che alla fine anche dosi alte dei germi morbosi viventi possono essere iniettate senza che si produca una sepsi invadente. Anche ripetute invasioni nel sangue dello stesso germe vengono sempre domate nello stesso modo. Tuttavia i processi reattivi che si svolgono nelle sempre ripetute invasioni del germe morbooso nel sangue e che accompagnano le reazioni di difesa nell'animale immune, provocano alla fine a loro volta alterazioni patologiche croniche, più precisamente soprattutto in tre punti dell'organismo, cioè nell'endocardio, nel miocardio e nelle articolazioni. Gli stessi processi che aiutano negli animali immuni a vincere anche la più grave infezione acuta danno luogo allo sviluppo del reumatismo articolare cronico. Nel cavallo datore di siero, nel quale si introducono ripetutamente e in grande quantità i germi morbosi, vediamo svilupparsi in modo particolarmente evidente questa triade di alterazioni: alterazioni verrucose alle valvole cardiache, callosità miocardiche, nonché alterazioni periarticolari ed endoarticolari, specialmente alle articolazioni del piede. Anche per questo reumatismo articolare reattivo sperimentalmente provocato vale la legge di *Lasègue*: «Le rhumatisme aigu lèche les jointures, la plèvre, les méninges même, mais il mord le coeur». La importanza primordiale per la produzione di questo quadro morbooso non spetta a una infezione locale al luogo delle alterazioni patologiche, bensì allo shock che si produce per la riunione intravitale dell'antigene ossia dei germi morbosi penetrati ex novo e in massa nel circolo sanguigno, e gli anticorpi specifici formati per le infezioni antecedenti.

Nell'uomo vediamo questo processo soprattutto nelle infezioni connesse alle così dette malattie da raffreddamento. I germi morbosi che sono qui in giuoco non vanno però ritenuti i germi specifici della malattia reumatica, perchè non soltanto essi, ma ogni bacillo che penetri ripetutamente nell'organismo e possa

provocare infezioni del sangue o generali, può generare lo stesso quadro. Pertanto nell'esperimento a ciò si riesce anche con antigeni non vivi, come ha effettivamente fatto *Klinge* in questi ultimi tempi. Non esiste dunque alcun germe specifico per questa malattia reumatica reattiva; d'altra parte essa si produce soltanto sulla base di una reazione antigene-anticorpo specifica nel senso sierologico.

Che anche delle infezioni croniche, a decorso a poussées, ossia ad es. la tubercolosi, possano provocare, negli esperimenti, quadri essenzialmente uguali, poté essere dimostrato istologicamente con ricerche in conigli reinfettati. Ma pel rimanente è risultato da ricerche in serie fatte per studiare questi fenomeni nella tubercolosi sperimentale, che le modificazioni reattive dei vasi basate su una immunizzazione sono di importanza determinante per il tipo di decorso di una infezione, e si riescì con gli esami isto-patologici a chiarire in dettaglio i rapporti patogenetici e il loro parallelismo coi suddetti processi di produzione di forme morbose reattive.

Dopo che ciò fu riconosciuto, ci parve essere « nobile officium » riprendere le antiche ricerche di *Behring* e *Römer*, in collaborazione con *Ph. Schwartz* dell'Istituto di Patologia di Francoforte s. M. In primo luogo è risultato che si possono immunizzare conigli con previo trattamento con germi viventi avirulenti in modo tale, che essi sopravvivono più o meno a lungo ad una infezione successiva prodotta per via intravenosa, la quale negli animali non trattati provoca la morte nello spazio di poche settimane; che anzi gli animali - ciò è soltanto una questione di dosi e di intervallo fra trattamento preventivo e infezione successiva - sopravvivono molti mesi e guariscono quasi completamente. Seguendo continuamente dal punto di vista anatomico e istologico lo sviluppo del processo morboso nell'animale immunizzato e in quello non immunizzato, risulta come dato essenziale che nell'animale previamente immunizzato non si producono più piccoli focolai di insediamento disseminato, comple-

tamente isolati, bensì ovunque l'insediamento si produce, l'intero organo come tale reagisce alla nuova infezione (reazione dell'organo). Inoltre sono i fenomeni della stasi e della dilatazione vasale studiati e descritti da *Ricker*, con allineamento marginale dei leucociti, emigrazione dei globuli bianchi, che per primi appaiono sotto l'epitelio (cuscini subepiteliari) e indi raggiungono gli spazi vascolari, dopo che già previamente, ad es. nei polmoni, si sono raccolte grandi quantità di essudato, sicché si produce il quadro della polmonite genuina.

Questa polmonite reattiva di rapida produzione, che da ultimo assume il carattere della infiltrazione a grandi cellule, esclude dapprima dalla respirazione grandi parti di polmone, ma, e questo è il dato essenziale, essa protegge anche contemporaneamente il tessuto polmonare dalla fusione caseosa, che altrimenti segue alla formazione di tubercoli. Si produce in larga misura il riassorbimento e la restitutio; la struttura dell'organo si mantiene, in quanto che parti sempre più estese dei polmoni ripartecipano alla respirazione, e si ha una guarigione non soltanto anatomica, ma anche funzionale. Le reazioni vascolari ed essudative che si producono nell'organismo previamente trattato e immunizzato provocano nei primi giorni dopo la rinnovata invasione del germe morboso un quadro morboso apparentemente grave, che è però di prognosi favorevole poichè gli organi a pronta reazione vengono difesi dall'azione distruttiva, ad evoluzione lenta, del germe morboso.

Nel diario di *Behring* del 1914 troviamo notizie, le quali dimostrano che nel corso delle sue ulteriori ricerche dopo la partenza di *Römer* per Greifswald, egli era venuto a risultati affatto uguali; mentre già molto tempo prima in lettere a *Fr. von Müller* aveva trattato del riassorbimento della polmonite tubercolare essudativa in analogia a quello della polmonite fibrinosa. Il punto essenziale di tutte queste concezioni basate su tali ricerche pato-fisiologiche sembra essere il dato di fatto, quale risulta in modo particolarmente chiaro nella infezione tu-

bercolare, che lo stesso germe morboso può provocare, secondo la differente condizione di immunità del soggetto infetto, quadri morbosi del tutto differenti, più precisamente i tre tipi seguenti:

1. Se la immunità manca, una malattia iniziante con incubazione più lunga ma poi rapidamente letale.

2. Se la immunità è di media forza, una malattia organica diffusa, che segue subito con reazione rapida alla reinfezione, in un primo tempo appare grave, ma ha tendenza alla guarigione.

3. Infine se la immunità è di alto grado, rapida eliminazione dei germi morbosi prima che riescano ad annidarsi; però se la infezione si ripete parecchie volte causa alterazioni degenerative reattive, che siamo abituati a designare col nome di affezioni reumatiche.

Con quale straordinaria frequenza tali reazioni avvengano nell'organismo risulta dal fatto, che ogni antigene ripetutamente penetrante nell'organismo, ossia essenzialmente ogni germe morboso, può provocarle. E non soltanto le malattie microbiche, perchè è recentemente risultato che anche i parassiti che prendono dimora nell'organismo danno luogo a processi immunitari dello stesso tipo e pertanto possono del pari causare alterazioni reattive in occasione delle reinfezioni, che sono in questo campo così frequenti.

Le nostre ricerche pato-fisiologiche fatte nell'intento di combattere le malattie e di ottenerne la guarigione appartengono dunque tanto per tecnica sperimentale quanto per scopi al campo della terapia sperimentale, che a suo tempo *Behring* separò dall'igiene, per creare un campo particolare di indagini e di dottrine.

Lo sviluppo della chemioterapia delle infezioni batteriche.

DR. R. SCHNITZER

Dall' Istituto Chemioterapico della I. G. Farbenindustrie A. G.

Werk Hoechst.

La chemioterapia delle infezioni batteriche data da circa venti anni. Gli sforzi fatti per combattere con mezzi chimici le infezioni batteriche sono vecchi quasi quanto la batteriologia stessa, ma ad onta delle ricerche assai larghe di *R. Koch* e di *E. v. Behring*, si andò formando una opinione troppo pessimistica sulle possibilità terapeutiche relative.

Soltanto quando *Morgenroth* scoprì l'azione specifica dell'etilidrocupreina (optochina) sulla infezione pneumococcica del topo, fu fatto il primo passo in questo campo fino allora assolutamente chiuso della disinfezione interna nelle malattie batteriche. Il lungo periodo di tempo intercorso tra le prime ricerche di *Koch* e di *v. Behring* d'un lato e la scoperta di *Morgenroth* d'altro lato e lo sviluppo relativamente lento che la chemioterapia delle infezioni generali batteriche ebbe anche dopo di *Morgenroth*, stanno ad indicare che a queste nuove direttive di ricerche si opposero non piccole difficoltà. Era ovvio di usare anche per le malattie batteriche i metodi di lavoro, così fruttiferi, che *Ehrlich* aveva applicato per la chemioterapia delle infezioni protozoiche; ma la metodica applicata alle infezioni protozoarie e le promettenti ipotesi di lavoro non furono senza altro applicabili alle infezioni batteriche, e dovettero essere elaborate totalmente di nuovo. In ultima analisi tutti i progressi erano legati a una appropriata metodica d'indagine, a ricerche tipo. Per quanto semplice possa essere in genere la sistemazione delle ricerche, esse presentano tuttavia una serie di problemi, che possono appena essere accennati nell'ambito di questa breve esposizione.

Il quesito più difficile della chemioterapia, la guarigione di una infezione generale a decorso settico, della infezione pneumococcica, è proprio quello che fu risolto per il primo. Poco dopo si poté dimostrare che anche altre infezioni generali batteriche, come la infezione carbonchiosa (*Schuster*); *Bettmann* e *Laubenheimer*) e il mal rossino dei suini (*Bierbaum*), potevano essere influenzate da rimedi chimici, più precisamente dal Salvarsan. Ma soltanto molti anni più tardi si poté avvicinarsi alla soluzione di un altro problema, quello di dominare con mezzi chimici un'altra importante infezione generale batterica, quella a base streptococcica; e ciò quantunque proprio essa avesse da lungo tempo maggiormente richiamata l'attenzione dei chemioterapisti.

La chemioterapia delle infezioni batteriche si era rivolta in particolare ai cocchi patogeni in base alle direttive inizialmente seguite; invero, la variazione chimica nel senso di *Ehrlich*, studiata nel campo degli alcaloidi della china, insegnò a conoscere un grande numero di composti, che agivano più o meno chiaramente su cocchi patogeni o su altri germi di infezione delle ferite, soprattutto su microorganismi grampositivi; questi composti, tra i quali divennero generalmente note la isoamilidrocupreina e la isooctilidrocupreina, mostrarono di essere efficaci su gli stafilococchi, gli streptococchi, i bacilli della difterite (*Braun* e *Schäffer*) e germi anaerobi patogeni. Esse si distinsero in primo luogo dal composto etilico omologo di azione strettamente specifica per una ampiezza di azione relativamente grande, ma in contrapposto non addimostrarono come questo la spiccata azione specifica su un microorganismo determinato, per quanto nell'ambito di serie omologhe risultassero accennati taluni «optima». Queste ricerche furono soprattutto utili perchè svilupparono e migliorarono la metodica e costituirono le basi per proficui studi ulteriori. Gli omologhi su citati, di struttura più elevata della idrocupreina (fino al composto octil; con l'aumentare della catena del carbonio l'effetto diminuisce) non hanno cioè alcuna azione sulle infezioni generali batteriche. Sono piuttosto caratterizzati da un'azione inibitrice notevole in vitro, e in vivo da un'azione antisettica locale. Sono antisettici chemioterapici, validi per la antisepsi profonda secondo *Klapp*, *Rosenstein* e altri. *Morgenroth* ha distinto nettamente dalla disinfezione interna questo caso speciale di efficacia chimica. Le tecniche di ricerca che sono a base dell'antisepsi chemioterapica furono usate con maggiore larghezza dopo che *Wright*, poi *Neufeld* e collaboratori ebbero dimostrato che per la etilidrocupreina e per il Salvarsan all'azione curativa nelle infezioni da pneumococchi, in quella del carbonchio e del mal rossino, corrisponde anche in vitro un'azione inibitrice e germicida sui germi relativi. Con ciò si era introdotto un metodo comodo, facilmente variabile, i cui risultati potevano dare un orientamento sulle proprietà chemioterapiche generali di nuovi composti. Che per altro i risultati di queste ricerche abbiano soltanto valore relativo, è risultato dalla ulteriore elaborazione di questo metodo; oggi si deve dire che la esperienza in vitro di inibizione allo sviluppo e di azione germicida può avere importanza soltanto come completamento dell'esperienza sugli animali. Un parallelismo tra ricerca in vitro e ricerca sugli animali esiste soltanto in misura limitata, ma proprio le differenze sono ricche di deduzioni importanti. Per gli antisettici

chemioterapici sono stati ideati come metodi sperimentali sugli animali i metodi della misurazione dell'effetto antisettico locale, o in forma dei metodi di antisepsi profonda su focolai infettivi chiusi (*Morgenroth e Abraham*) o su ferite infette aperte (*Brunner e Gonzenbach; Neufeld, Schiemann e collaboratori; Braun e Feiler*).

Fu questa la base tecnica sperimentale sulla quale fu costruita la chemioterapia dei cocci patogeni e di altri germi dell'infezione delle ferite. Per particolari considerazioni chimiche che in parte sono in rapporto con le esperienze fatte sulla variazione degli alcaloidi della china, furono prese in considerazione soprattutto le sostanze coloranti acridiniche.

II.

Volendo sintetizzare con poche parole quale importanza abbiano, oltre alle loro proprietà ormai generalmente note e praticamente utilizzate, i coloranti acridinici battericidi, i più importanti dei quali sono la Tripaflavina (cloruro di 3,6-diammino-10 metilacridina) e il Rivanolo (lattato di 2- etossi- 6,9- diamminoacridina), si può dire che colla scoperta e l'ulteriore sviluppo di questi preparati si fecero altri notevoli progressi nell'ambito della chemioterapia degli streptococchi.

Entrambi i composti, ma in particolare la Tripaflavina, sono rimedi chemioterapici di « ampiezza » relativamente grande, ossia con effetto esteso a tutta una serie di tipi batterici anche biologicamente l'un dall'altro lontani. Oltre a cocci patogeni, tra i quali hanno particolare importanza, per ragioni di cui si dirà qui sotto, gli streptococchi, gli stafilococchi e i gonococchi, vengono influenzati anche bacilli grampositivi (ad es. i difterici) e gramnegativi (gruppo tifo-coli, gruppo brucella) e i germi del tipo pasteurella, nonchè i vibrioni. L'azione battericida del Rivanolo si esplica in modo elevato soltanto su una parte dei germi su nominati, ma raggiunge l'optimum sugli strepto- e sugli stafilococchi. Questa constatazione si basa soprattutto sui risultati delle esperienze in vitro. Per il gruppo dei coloranti battericidi è risultata la regola, che quei composti, che hanno effetto positivo nelle esperienze sugli animali, hanno anche effi-

cacia più o meno grande in vitro. Ma questa regola non ha valore inverso. Esiste pertanto una certa indipendenza tra esperienza in vitro ed esperienza in vivo - a base di questa affermazione è posta l'azione locale, antisettica nel tessuto vivente - in quanto l'esperienza in vitro non dà indicazioni sicure per l'efficacia nell'organismo infetto. È caratteristico per questo comportamento il confronto tra Rivanolo e Tripaflavina nei loro effetti sugli streptococchi emolitici, confronto fatto in base ad un largo materiale da esperimento.

TABELLA 1

Riassunto di ricerche in vitro con Tripaflavina sopra 65 ceppi differenti di streptococchi

Concentrazione germicida	Azione su ceppi di streptococchi	
	Numero	%
superiore a 1: 100.000	11	16,9
1: 100.000 — 400.000	26	40
1: 500.000 — 1.000.000	13	20
1:1.000.000 — 3.000.000	11	16,9
1:5.000.000 e meno	4	6,2
	65	

TABELLA 2

Riassunto di ricerche in vitro con Rivanolo sopra 231 ceppi differenti di streptococchi

Concentrazione germicida	Azione su ceppi di streptococchi	
	Numero	%
1: 20.000	6	} 10
1: 40.000	16	
1: 80.000	72	} 83
1:160.000	72	
1:320.000	48	
1:640.000	17	7
	231	

Si riconosce facilmente che per entrambi i composti esiste un grosso gruppo intermedio di stipiti, che addimostrano una influenzabilità normale. Colla Tripaflavina questa normalità si muove nella concentrazione di 1:100000 a 1:3000000, col Rivanolo il livello è un po' più basso e oscilla da 1:80000 a 1:320000.

Le tabelle qui unite riassumono i risultati dei due tipi di esperimento.

TABELLA 3

Riassunto dei risultati di esperienze di disinfezione per via sottocutanea con Tripaflavina su 30 ceppi di streptococchi emolitici

Concentrazione germicida	Azione su ceppi di streptococchi	
	Numero	%
1: 10.000 e più	3	10
1: 20.000	10	33
1: 40.000	12	40
1: 80.000	5	17
	30	

TABELLA 4

Riassunto dei risultati di esperienze di disinfezione per via sottocutanea con Rivanolo sopra 181 ceppi di streptococchi emolitici

Concentrazione germicida	Azione su ceppi di streptococchi	
	Numero	%
1: 5.000	2	9
1: 10.000	14	
1: 20.000	49	79
1: 40.000	56	
1: 80.000	38	
1: 120.000 e meno	22	12
	181	

Da queste due ultime tabelle (3^a e 4^a) risulta che nelle esperienze sugli animali la Tripaflavina e il Rivanolo sono presso a poco di valore uguale e che ad onta delle divergenze in vitro, in

vivo la maggior parte degli streptococchi è influenzata dalle concentrazioni medie di 1:20000 fino a 1:80000. *Morgenroth* ha considerato elemento particolarmente favorevole la vicinanza dell'azione in vivo e quella in vitro quale si constata nel Rivanolo.

Il quoziente assoluto di disinfezione calcolato in base a $\frac{\text{concentrazione germicida nei tessuti}}{\text{concentrazione germicida in vitro}}$, che valse anche come misura della azione direttamente antisettica non ostacolata dalle cellule tessurali, doveva essere quanto più possibile grande, come ideale $= 1$ (Rivanolo 1:2-2,5). L'efficacia del Rivanolo si afferma sugli streptococchi dell'uomo e degli animali, come è stato dimostrato in Clinica recentemente da *Seelemann* per gli streptococchi della mastite delle mucche. La combinazione coi coloranti nitroacridinici, di cui si dirà nel capitolo seguente, attiva il Rivanolo in modo specifico. Questa combinazione è stata praticamente utilizzata nei preparati di Entozon.

I vari campi di applicazione della Tripaflavina da un lato e del Rivanolo d'altro lato, derivano indipendentemente da determinati fattori, quali il carattere della sostanza colorante e la tossicità generale, dalle proprietà specifiche dei due composti verso altri germi morbosi; mentre il Rivanolo possiede, corrispondentemente alla sua azione sugli streptococchi, una efficacia talvolta anche maggiore verso gli stafilococchi, la Tripaflavina ha praticamente importanza per la sua efficacia sui gonococchi. Non abbiamo bisogno di richiamare l'attenzione sulla difficoltà di dimostrazione dell'efficacia sui gonococchi, che, come noto, non provocano negli animali da esperimento infezioni genuine. La spiccata sensibilità che i gonococchi dimostrano in vitro verso numerose sostanze non permette di trarre deduzioni sicure per la Clinica; fu pertanto necessario di creare esperienze speciali sugli animali; con esse si è potuto stabilire che la Tripaflavina uccide i gonococchi nell'organismo vivente già a una diluizione di 1:50000-100000. Questa diluizione potrà sembrare scarsa rispetto alle minime concentrazioni (1:2-5000000) che sono attive in vitro, ma costituisce un optimum di effetto

per i gonococchi, che sono assai difficilmente influenzabili in vivo e spiega i risultati ottenuti in Clinica colle iniezioni intravenose nonchè colle cure locali uretrali e cervicali. Del valore profilattico dei coloranti acridinici verso i germi anaerobi delle ferite basta far cenno. Secondo *R. Goldschmidt* la dimetossi-10-metilacridina, poco tossica, ha in tale campo un'azione particolarmente buona e sicura.

III.

Passando ora alla chemioterapia di infezioni generali sarebbe ovvio di attendersi da composti, che hanno un'efficacia così spiccata sui cocci patogeni, ossia dalla Tripaflavina e dal Rivanolo, che esercitino influenza anche sulle infezioni generali. Ma così non è, o per lo meno soltanto in condizioni particolarmente favorevoli e raramente riproducibili si può ottenere la guarigione ad es. di infezioni strepto- o pneumococciche; un risultato che trova conferma nella pratica clinica.

Nelle affezioni settiche umane il Rivanolo e la Tripaflavina possono essere efficaci, ma tale risultato non può sempre ottenersi, anzi può ottenersi soltanto in singoli casi particolarmente favorevoli. Agli antisettici chemioterapici, e in particolare alla Tripaflavina e al Rivanolo, si richiedono qualità ben differenti che ai disinfettanti interni. Per i primi il requisito principale è la mancanza di irritazione locale e un effetto antisettico permanente, che presuppone un certo grado di organotropismo («impregnazione antisettica», *Morgenroth*). Nel secondo caso deve prevalere decisamente il parassitotropismo; in una alla rapida ripartizione in tutto l'organismo infettato, il disinfettante interno deve essere così atossico, che delle concentrazioni attive del rimedio circolino almeno per qualche tempo e possano essere tenute sufficientemente alte mediante una congrua ripetizione della cura.

Composti dotati di tali proprietà sono stati trovati nella serie delle sostanze coloranti acridiniche; essi appartengono al gruppo

delle nitro-acridine sostituite, che con una tossicità relativamente minima e un'azione in vitro elevatamente specifica verso gli streptococchi, guariscono regolarmente l'infezione generale da streptococchi emolitici.

Il gruppo chimico che assicura questa efficacia è essenzialmente il gruppo NO_2 , come risulta dalla seguente tabella 5.

TABELLA 5

Efficacia di derivati della 9-amminoacridina con e senza gruppo nitro

Prepar. N.	Concentrazione germicida		Effetto sulle infezioni generali	Prepar. N.	Concentrazione germicida		Effetto sulle infezioni generali
	in vitro	nei tessuti			in vitro	nei tessuti	
3043	1:10.000.000	1:50.000	+	2981	1:100.000	1: 300	0
2946	1: 3.000.000	1:25.000	+ +	2100	1: 75.000	1: 100	—
3043 a	1: 4.000.000	1:20.000	+ + +	3571	1: 50.000	1:1.000	0

con gruppo nitro

senza gruppo nitro

Spiegazione delle abbreviazioni.

0	= nessun effetto	} coll'espe- rimento contem- poraneo
+	= dose tollerata che guarisce il 50% degli animali	
+ +	= dose tollerata che guarisce il 70-100% degli animali	
+ + +	= meno della dose tollerata che guarisce il 70-100% degli animali	

Il migliore composto di questo gruppo, che influenza ancora sicuramente le infezioni streptococciche acute e croniche con $\frac{1}{5}$ - $\frac{1}{10}$ della dose tollerata, ha anche spesso dato la guarigione della sepsi streptococcica umana.

Secondo la esperienza clinica di *Friedemann*, riguardante empiemi streptococcici della pleura di prognosi particolarmente sfavorevole, anche l'applicazione locale di tali composti può valere a salvare la vita mercè la rapida sterilizzazione delle grandi cavità infette. Si deve raffigurarsi come un'azione diretta sugli streptococchi, il meccanismo di azione delle nitroacridine; più precisamente, come è risultato da ricerche ulteriori, con un luogo di azione diverso da quello dei composti aurici di cui si dirà qui sotto. Oltre ad altri dati che confortano questa opinione, parla in favore di essa soprattutto la assai rapida uc-

cisione dei germi, che - come si è potuto constatare con particolari ordinamenti sperimentali - si compie nell'organismo infetto già nello spazio di pochi minuti.

Tali effetti non sono pressochè ottenibili con altri composti; anche le esperienze di *Browning* e collaboratori coi composti chinolinici del tipo del quinanil non sono gran che persuasive, perchè si applicò una cura locale. Invece i composti aurici esercitano pure - come dimostrarono per i primi *Feldt* e *Schiemann* - un'azione favorevole sulla infezione generale streptococcica.

Questa azione spetta in misura più o meno grande a quasi tutti i composti aurici, che riguardo alla tossicità e all'efficacia si differenziano soltanto per gli indici chemioterapici, i quali oscillano tra $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{10}$ - $\frac{1}{15}$. Il fatto, che la maggior parte dei composti aurici - non però tutti - danno a riconoscere in vitro soltanto un'azione inibitrice o distruttiva straordinariamente debole rese difficile la spiegazione del meccanismo di azione. Si aggiunga che nel campo principale di applicazione dell'oro, la tubercolosi o la lebbra, le osservazioni cliniche parlano piuttosto, in contrapposto colle idee esposte da *Mollgaard* riguardo alla sanocrisina, per un'azione indiretta, per una modificazione aspecifica. Sembrò pertanto che i composti aurici esplicassero un'azione curativa indiretta «catalitica». Ma ricerche numerose fatte con molte varianti chimiche e con vari ordinamenti sperimentali parlano per il concetto che nelle infezioni streptococciche (e anche in quelle da spirochete) agiscono forze parassiticide dirette nel senso di *Ehrlich*.

Gli stretti rapporti tra altezza di dose ed effetto curativo e la rapidità colla quale avviene la sterilizzazione dell'organismo, sono alcuni dei dati di fatto che appoggiano questa opinione.

IV.

La questione delle dosi ossia la constatazione che si deve somministrare una determinata dose di oro (dose terapeutica minima), la quale può nei limiti della tolleranza essere aumen-

tata, ma non diminuita, fu posta espressamente in primo piano. Ciò permette la delimitazione rispetto a quel campo particolare della chemioterapia delle infezioni batteriche, che comprende gli studi di *Walbum* sulla « terapia con sali metallici ». Troviamo qui una limitazione di effetto circoscritto a un optimum di dosi, assai piccole, al di sopra e al di sotto delle quali l'effetto manca. Qui fu pure rilevato un fatto insolito, che è importante per la riproducibilità delle esperienze: l'influenza che ha l'alimentazione sulle proprietà terapeutiche dei sali metallici. Ad es. si riescì a far guarire nei topi col cloruro di cesio la infezione per via alimentare, soltanto quando gli animali non erano nutriti con latte. Oltre al sale di cesio anche il cloruro di iridio agisce su questa infezione, mentre il cloruro di stagno o di zirconio avrebbero una certa influenza sulla infezione stafilococcica.

Queste esperienze sono, secondo le stesse parole di *Walbum*, difficilmente riproducibili; per quanto riguarda l'influenza sulle infezioni generali stafilococciche, ciò concorda con la mia esperienza personale, dalla quale risulta che questa infezione segue rispetto alla guaribilità regole differenti da quelle alle quali eravamo finora abituati.

Tuttora alquanto discussi sono i risultati di *Walbum* nella tubercolosi sperimentale delle cavie e dei conigli, nei quali una cura protratta a lungo con cloruro di cadmio e di manganese darebbe la guarigione. Anche qui i sali metallici vengono dati a dosi basse, secondo un optimum, graduate in base alla reazione dell'animale. La tubercolosi e del pari la lebbra hanno dal punto di vista della cura un posto a sè, perchè per entrambe l'empirismo clinico sistematico ha preceduto le indagini di Laboratorio. La efficacia dei composti aurici, in determinati casi di tubercolosi polmonare viene in genere ritenuta come un'azione aspecifica, trasformante i tessuti; e del pari il meccanismo d'azione degli eteri dell'olio di chaulmoogra e oli affini, nonchè dei preparati aurici sulla lebbra non va ritenuto senz'altro come chemioterapico, in senso stretto, ossia come parassitocida.

Non è escluso che la lebbra dei ratti possa essere un tipo di sperimentazione adatto per fornire nuove nozioni in questo campo, per trovare nuovi composti attivi. Le ricerche di *Meissner e Hesse*, che stabilirono il valore curativo dei rimedi tanto in vitro col metodo capillare di *Wright*, quanto in vivo nelle cavie e nei conigli superinfettati, stanno ad indicare che anche nella tubercolosi si possono trovare composti di genuina efficacia chemioterapica, un concetto che trova appoggio anche nella scoperta di *Jessen* sulla possibilità di colorazione vitale di focolai polmonari. I preparati finora meglio studiati, come il bleu di indamina, la safranina, il tannineliotropio, rappresentano i primi passi per studi ulteriori.

Campi vasti della chemioterapia delle infezioni batteriche non sono ancora stati studiati o sono stati studiati assai poco, oppure le ricerche relative non sono ancora state consegnate nella letteratura. Ma la metodica di tali ricerche è sufficientemente sviluppata per poter fare almeno tentativi empirici anche in campi finora chiusi. La cosa principale da trovare è sempre un metodo di esperimento sugli animali regolarmente riproducibile, ben noto nel suo svolgimento e variabile, metodo col quale si possano provare nuovi rimedi chemioterapici, e dopo averli constatati attivi si possa indagare il meccanismo di azione in modo da conoscere i rapporti tra costituzione ed effetto, nozione la quale è necessaria per elaborare un composto con optimum di effetto.

Poche parole ancora sulla biologia chemioterapica dei germi morbosi batterici. *Ehrlich* intese di indicare con questa denominazione quei fenomeni che abbiamo imparato a conoscere tra altro studiando la resistenza specifica ai medicamenti. Una resistenza genuina ai medicamenti è finora nota soltanto per i pneumococchi, i quali con un dosaggio cautamente aumentato possono essere resi del tutto insensibili, in vitro e in vivo, alla etilidrocupreina, e talvolta, con dose assai bassa, addimostrano anche (*Schnabel*) uno stadio transitorio di ipersensibilità.

Molti altri batteri - la maggior parte delle ricerche di questo genere poterono essere fatte soltanto in vitro - presentano anche fenomeni di assuefazione, che danno luogo ad una elevata resistenza verso i rimedi usati; essi sono però molto modificati anche dal punto di vista morfologico e funzionale, tanto che questi fenomeni possono essere considerati assai simili a quelli della resistenza genuina, che riguarda soltanto la sensibilità verso l'agente provocante la resistenza. Per lo più manca anche il requisito principale della specificità della resistenza. Particolarmente interessanti le condizioni per gli streptococchi, che sono state studiate più in dettaglio mediante le sostanze coloranti acridiniche. Gli streptococchi emolitici possono sfuggire all'azione dei composti acridinici, perdendo la facoltà emolitica e la sensibilità chimica, e simulare una guarigione. Ma appena che questi germi biologicamente minorati ritornano allo stato di virulenza con ripristino della facoltà emolitica, si possono produrre recidive. Recentemente si è riusciti nel Laboratorio di Hoechst ad ottenere uno streptococco auro-resistente, che era a ritenersi come un ceppo genuinamente resistente ai medicinali. Le ricerche fatte con questo stipite permisero un'analisi interessante dell'azione dell'oro e una differenziazione di vari tipi di composti aurici. Lo stipite resistente all'oro, era sensibile all'acridina.

Resistenza ai medicinali e perdita della virulenza sono due fenomeni che impongono alla chemioterapia dei compiti non sempre facilmente raggiungibili.

Il compito più importante e più difficile è quello della « *sterilisatio magna* » che già ai tempi di *Ehrlich*, come attualmente, è la meta fondamentale di una efficace chemioterapia delle infezioni batteriche.

La immunità nelle malattie da protozoi

DR. WALTER KIKUTH

Dall'Istituto chemioterapico della I. G. Farbenindustrie A. G.

Werk Elberfeld.

In contrapposto alla immunità verso le malattie batteriche, il cui quadro complessivo è, se non completamente, essenzialmente chiarito il campo della immunità nelle malattie provocate da protozoi appare ancor oggi problematico e oscuro. Non soltanto su alcuni problemi fondamentali abbiamo nozioni scarse o nulle, ma anche quei problemi che apparivano semplici non sono ancora del tutto ben chiariti, dati i risultati contraddittori delle ricerche dei singoli autori. Le ragioni di questa nostra incertezza sono di varia natura e sono soprattutto dovute alla particolarità dei protozoi, in qualità di esseri viventi a sè, e al decorso caratteristico delle infezioni da essi provocate, decorso che per molti aspetti è diverso da quello delle infezioni batteriche. Per eliminare le difficoltà che si presentano nello studio del problema della immunità nelle affezioni protozoiche, dobbiamo illustrare più da vicino una serie di proprietà caratteristiche dei protozoi, le quali in pari tempo fanno intendere che i risultati ottenuti in batteriologia non possono essere senz'altro trasportati alle affezioni protozoiche.

Una grande differenza tra i batteri e i protozoi consiste in ciò, che i protozoi, in contrapposto ai batteri - a parte poche eccezioni - non si possono coltivare su terreni artificiali e anche nei pochi casi nei quali una cultura di protozoi è riuscita, si tratta di culture che non possono essere paragonate alle culture pure di batteri. Ad es. si riesce bensì a coltivare in terreni artificiali la « amoeba histolytica », il germe della dissenteria amebica, ma finora non si è riusciti a separare questo germe dai batteri concomitanti contemporaneamente presenti, che a quanto pare sono necessari per la esistenza, la facoltà di moltiplica-

zione e la virulenza delle amebe. La differenza tra una tale cultura mista di amebe e di vari ceppi batterici e una cultura di batteri è senz'altro chiara.

In un'altra malattia protozoica dell'uomo, il Kala-azar, malattia infettiva assai diffusa in India e in China, si riesce bensì ad ottenere in cultura pura il germe di questa malattia, la « leishmania donovani », ma esso soggiace a tali modificazioni morfologiche che gli individui ottenuti in cultura non hanno più alcuna rassomiglianza coi parassiti presenti nell'organismo. Si può pure ammettere con sicurezza che insieme a questa profonda modificazione morfologica si modifica contemporaneamente tutto il ricambio dei parassiti.

Un'altra circostanza che rende difficile lo studio dei protozoi è che molti di essi si adattano strettamente all'organismo ospite, che non possono in genere più esistere - salvo che nei loro trasmettitori naturali - all'infuori dell'organismo ospite. Ad es. la più importante affezione protozoica dell'uomo, la « malaria », non può essere trasmessa ad altri animali. E anche tra le « piroplasmosi », diffuse in moltissime specie di animali, si può constatare un adattamento completo all'organismo ospite relativo.

Altri protozoi possono bensì essere trasmessi ad altre specie animali, ma provocano in esse quadri morbosi tutt'affatto diversi, che non presentano alcuna rassomiglianza colla malattia dell'organismo ospite originario. Se ad es. si inocula a topi il « trypanosoma brucei » germe del « nagana », una epizoozia africana, i tripanosomi si moltiplicano quasi esclusivamente nel sangue; si produce in breve tempo una inondazione di tripanosomi nel sangue, una specie di « sepsi tripanosomica », e gli animali soggiacciono in breve tempo alla infezione.

In modo affatto diverso si svolge la infezione se si inocula lo stesso germe ai conigli. Anche qui si ha moltiplicazione dei tripanosomi, ma non prevalentemente nel sangue, bensì soprattutto nei tessuti, dove essi provocano gravi disordini e danni. La malattia assume un decorso cronico, ma la infezione finisce

poi sempre coll'uccidere l'animale. Se infine si inocula il « tryp. brucei » a pecore o a capre, si ha in un primo tempo una moltiplicazione dei tripanosomi, ma nella maggior parte dei casi la malattia guarisce da sè.

Cotali differenze, nel decorso della infezione nelle varie specie animali, si possono, è ben noto, osservare anche coi batteri, ma nei protozoi esse sono molto più spiccate. Lo stesso dicasi per le oscillazioni di virulenza e per le possibilità di modificazione delle proprietà biologiche, così caratteristiche in alcune specie protozoiche. Come si può osservare con particolare frequenza nei tripanosomi, bastano già modificazioni minime dell'ambiente per provocare modificazioni essenziali delle proprietà biologiche. Così si può ad es. separare biologicamente l'uno dall'altro i diversi stipiti di tripanosomi provocanti recidive che si presentano durante il decorso della infezione. Talvolta basta un unico passaggio negli animali, per far scomparire completamente la patogenicità degli stipiti tripanosomici relativi per un'altra specie di animali.

Mentre coi batteri si possono imitare anche in Laboratorio le condizioni naturali di trasmissione ad ospiti intermedi, ciò riesce soltanto assai raramente coi protozoi, perchè essi nella grande maggioranza dei casi sono trasmessi da ospiti intermedi che è spesso difficile di conservare e coltivare nei Laboratori.

Da tutte queste ragioni si può assai facilmente capire contro quali difficoltà si urti nello studio dei problemi di immunità nelle malattie da protozoi.

Spesso si è costretti ad accontentarsi di ipotesi e di deduzioni fatte per analogia, soltanto in pochi casi si è riusciti ad ottenere risultati univoci.

A ciò si aggiunga, che la immunità non è biologicamente una concezione unica, ma è dovuta a cause varie e, date le possibilità biologiche di variazione dei protozoi, che si alternano nell'organismo ospite, è ancora più complicata.

Passando ora ai problemi propri della immunità, dobbiamo

constatare a priori che una immunità naturale, quale può essere dimostrata rispetto ai batteri mediante la presenza di fattori battericidi nel siero di organismi, non si osserva invece in questo senso rispetto ai protozoi. Come per i batteri, anche per i protozoi la ricettività dell'organismo non costituisce la regola bensì la eccezione, ma la mancanza di ricettività non è dovuta a immunità naturale, in quanto che non sono dimostrabili anticorpi; è invece dovuta a una resistenza naturale.

Per quanto riguarda la immunità acquisita, che si produce soltanto durante il decorso di una infezione, essa pure è nei protozoi più complicata che nei batteri. Una immunità acquisita completa o assoluta, quale si produce in alcune malattie batteriche dopo aver sorpassato una infezione, non esiste in genere nei protozoi. Una sola eccezione ha forse la febbre litorea dei bovini, una malattia largamente diffusa nell'Africa meridionale, che è una piroplasmosi, ha decorso assai tumultuoso, ha una mortalità straordinariamente elevata e a quanto pare dà una immunità assoluta per tutta la vita. Ma anche questa malattia permette secondo *Reichenow* un'altra interpretazione, cioè quella di una limitata facoltà di riproduzione dei parassiti, similmente a quanto avviene in certe coccidiosi intestinali. La immunità completa e permanente può infine essere simulata dalla persistenza di germi morbosi latenti.

Non si può neppure parlare per ora, sempre in riguardo ai protozoi, di una immunità verso le tossine, perchè se pure si deve ammettere in linea di ipotesi l'esistenza di tossine nei protozoi, essa, salvo poche eccezioni, non è dimostrata.

Ad onta di tutto ciò possiamo fare nelle malattie da protozoi osservazioni molto interessanti sui « fenomeni di immunità », che si esplicano nel modo più caratteristico colla così detta « infezione labile » o con la « immunitas non sterilisans ».

Andrei troppo lontano se volessi riferire qui i singoli fatti constatati nelle varie malattie infettive. Cercherò pertanto di riassumere i fenomeni immunitari e contemporaneamente di

prendere in considerazione da un punto di vista generale le singole particolarità.

I protozoi patogeni dell'intestino (amebe, ciliati, flagellati) non entreranno nelle nostre considerazioni, perchè i processi immunitari relativi non sono quasi affatto noti. Lo stesso dicasi per il germe del Kala-azar, la leishmania donovani, che se non è combattuto con medicamenti provoca quasi sempre la morte.

I protozoi del sangue possono essere divisi in due grandi gruppi. Al primo gruppo appartengono quei protozoi, che non risiedono soltanto nel sangue ma si sviluppano anche nei tessuti dell'organismo ospitante; a questo gruppo appartengono ad es. i tripanosomi patogeni. All'altro gruppo possono essere ascritti i protozoi propri del sangue, che vivono parassitariamente negli eritrociti, come i parassiti della malaria, i piroplasmi, così diffusi nel regno animale, e quelli che si moltiplicano nel plasma sanguigno, come i tripanosomi non patogeni.

Per il primo gruppo si hanno, nella lotta dell'organismo contro i parassiti, delle reazioni immunitarie, che però sono di regola troppo deboli per avere il sopravvento, sicchè alla fine la lotta finisce colla completa vittoria dei parassiti sull'organismo. Nel secondo gruppo si produce invece la forma particolare della così detta « infezione labile » o « immunitas non sterilisans », uno stato di equilibrio tra organismo e parassitismo, che può protrarsi per anni e alla fine avere esito in guarigione completa, quando per offese di qualsiasi genere non si abbia l'attivazione del processo morboso.

Il decorso della infezione provocata da tripanosomi patogeni, i germi della malattia del sonno dell'uomo e di molte epizoozie diffuse in tutto il mondo, si svolge in questo modo nell'organismo ospite naturale:

Dopo un certo periodo di incubazione, i tripanosomi patogeni compaiono nel sangue periferico dell'organismo infettato e vi si moltiplicano finchè hanno raggiunto una certa quantità.

Improvvisamente segue poi la scomparsa dei tripanosomi

dal sangue; non li si trovano nè coll'esame microscopico, nè si riesce a dimostrarli inoculando il sangue ad animali ricettivi. La scomparsa dei tripanosomi è dovuta alla presenza di un prodotto reattivo immunizzante, sulla cui natura non si sa pressochè nulla, ma le cui proprietà tripanolitiche possono essere dimostrate in vivo e in vitro.

Ma abitualmente un certo numero di tripanosomi sfugge alla distruzione, sia perchè i tripanosomi presenti negli organi non sono raggiunti dagli anticorpi, sia perchè certi esemplari hanno una particolare resistenza verso gli anticorpi.

Quei tripanosomi che si sono dimostrati resistenti verso gli anticorpi si moltiplicano di nuovo e formano un così detto stipite della recidiva. L'anticorpo presente nel siero, formatosi per l'azione dello stipite originario, mantiene ancora per lungo tempo le sue proprietà tripanolitiche verso lo stipite originario, ma è quasi impotente verso lo stipite della recidiva di nuova formazione.

Ma quando i tripanosomi modificati dallo stipite della recidiva si sono moltiplicati fino a un certo punto, si produce in qualità di reazione dell'organismo un nuovo anticorpo verso lo stipite della recidiva, nuovo anticorpo che è in grado di distruggere la massa principale dei parassiti. Ma di nuovo restano alcuni individui, che si dimostrano resistenti verso il nuovo anticorpo, che si moltiplicano di nuovo e in tal modo danno luogo ad un secondo stipite di recidiva.

Questo decorso morboso ciclico con comparse e scomparse periodiche dei tripanosomi (crisi tripanolitiche) può protrarsi, come nella malattia del sonno dell'uomo, per anni. I tripanosomi riformano continuamente nuovi ceppi di recidive e l'organismo risponde ogni volta colla formazione di un nuovo anticorpo tripanolitico. La facoltà dei tripanosomi di formare nuovi tipi e quella dell'organismo di formare nuovi anticorpi sembra essere illimitata.

Ma di regola a lungo andare l'organismo soggiace alla in-

fezione. Le facoltà di resistenza dell'organismo si affievoliscono sempre più dopo ogni avvento di un nuovo stipite di recidiva, e i tripanosomi, che non si moltiplicano esclusivamente nel sangue ma anche altrove, dove non sono o sono poco accessibili agli anticorpi, prendono il sopravvento.

In modo essenzialmente diverso si svolge la reazione immunitaria quando si tratta di tripanosomi apatogeni. Ad es. il « tryp. lewisi » dei ratti, all'inizio della infezione si moltiplica abbastanza vivacemente nel sangue periferico, con la produzione delle più varie forme di suddivisione. Quando la moltiplicazione ha raggiunto un certo grado e i tripanosomi sono presenti nel sangue in numero non piccolo, la ulteriore moltiplicazione cessa improvvisamente, però le forme di suddivisione non scompaiono completamente dal sangue e il loro numero diminuisce soltanto progressivamente. Come *Tagliaferro* ha potuto dimostrare, la cessazione della moltiplicazione dipende dalla produzione nel sangue di un prodotto che ha soltanto la proprietà di sospendere la moltiplicazione dei tripanosomi, senza per altro danneggiarli menomamente.

Per questo anticorpo particolare, che sospende la facoltà di suddivisione dei tripanosomi, e che è caratterizzato anche da altre proprietà, *Tagliaferro* ha proposto recentemente il nome di « Ablastin ».

Insieme a *Regendanz* io ho potuto confermare i dati di *Tagliaferro* e dimostrare che il prodotto di reazione inibente la moltiplicazione (Ablastin) è soprattutto formato dalla milza. Se cioè all'inizio della infezione si estirpa la milza ai ratti, si può di solito constatare che la moltiplicazione dei tripanosomi si protrae per un periodo di tempo assai più lungo e che il « tryp. lewisi », apatogeno, in molti casi assume carattere di patogenicità.

La immunità delle così dette infezioni labili, della quale si dirà ora, dipende da un equilibrio tra organismo ospite e parassitismo, equilibrio che si sviluppa nel corso della infezione e può mantenersi per anni. L'organismo forma solo tante

forze difensive quante sono strettamente necessarie per mantenere a dovere i parassiti, ossia perchè non avvenga una notevole moltiplicazione dei parassiti stessi.

In tale stadio di una infezione labile già prodottasi, è talvolta straordinariamente difficile dimostrare i parassiti nell'organismo ospite. Ma se in tali casi si inocula ad altri animali della stessa specie il sangue di un animale apparentemente sano, si riesce con facilità, specialmente negli animali giovani, a provocare una infezione, la quale a sua volta, dopo passati gli accessi acuti, trapassa nello stadio dell'infezione labile. Se invece si tenta di reinfettare degli animali nello stadio dell'infezione latente, ciò non riesce; non si ha moltiplicazione dei parassiti.

E' generalmente noto che il sistema reticolo-endoteliale partecipa in molte infezioni alla lotta contro i germi, e sembra che esso abbia la parte difensiva principale rispetto ai parassiti del sangue intracorporeali, in quanto che mediante la fagocitosi evita la moltiplicazione senza limite dei parassiti e mantiene l'equilibrio labile. Ad es. nella piroplasmosi si trovano spesso grosse cellule mononucleari, che hanno fagocitato gli eritrociti infettati insieme ai parassiti.

Tra l'apparato reticolo-endoteliale sembra che una parte speciale spetti alla milza, parte che alcun altro organo può assumersi nella stessa misura.

Togliendo questo organo difensivo, estirpando la milza, si può constatare che l'infezione si svolge in modo molto più acuto, e che non si produce in genere un'infezione labile.

D'altra parte se esiste una infezione labile si può con l'estirpazione della milza rompere l'equilibrio in atto, sicchè si producono gravi recidive, che spesso hanno esito in morte.

Gonder e Rodenwaldt sono stati i primi che hanno richiamato l'attenzione sulla importanza difensiva della milza nella piroplasmosi dei cani; poterono con l'estirpazione della milza portar fuori dallo stato di equilibrio l'infezione labile.

Con l'artificio dell'estirpazione della milza si riesce talvolta

a scoprire piroplasmosi fino allora ignote, perchè i pochi parassiti che all'esame microscopico erano sfuggiti, si moltiplicano rapidamente (*Regendanz e Kikuth*).

Se ora passiamo a considerare la malaria, la più importante malattia protozoica umana, vediamo che le condizioni sono simili.

Taluni dati parlavano già in passato per il concetto che nella malaria il reticolo-endotelio e soprattutto la milza partecipassero alla produzione di una malaria latente. Il tumore splenico, che si sviluppa regolarmente durante l'infezione malarica acuta, può essere fino a un certo punto considerato come espressione di ipertrofia di un organo immunitario. Per dirla con *Mühlens*, la mancanza della milza significa per l'organismo la mancanza di un organo di difesa. Si è cioè già ripetutamente osservato che nell'uomo alla estirpazione della milza seguono recidive malariche gravi ed anche letali.

Il reperto frequente di pigmento dei parassiti malarici nei grossi leucociti mononucleari e nelle cellule dell'endotelio appoggia ulteriormente questo concetto. Inoltre è vecchia osservazione che i casi di malaria chinino-resistenti e a decorso particolarmente grave sono caratterizzati da una tumefazione minima della milza, mentre spesso nei casi leggerissimi si ha un notevole tumore di milza. Anche nei paralitici infettati artificialmente di malaria si fa una constatazione simile.

Questi dati e queste osservazioni fatte nella malaria umana hanno trovato base e appoggio sperimentale nelle ricerche fatte da *Gonder e Rodenwaldt* nella malaria delle scimmie. Questi autori infettavano le scimmie col «*plasmodium kochi*», una specie assai prossima ai parassiti della terzana, smilzavano gli animali e constatavano allora un decorso più violento dell'infezione.

Della importanza della milza come organo immunizzante non c'era da dubitare anche per la malaria umana, e la regola fissata da *Roberto Koch*, che una milza grossa deve essere considerata segno di una immunità relativa, vale appieno anche oggi.

Ma soltanto le ricerche più recenti hanno chiarito come si

svolgano in dettaglio i processi immunitari e in qual modo la milza eserciti la sua azione difensiva; molti problemi restano tuttavia ancora insoluti.

La malaria degli uccelli, che è stata utilizzata per chiarire molti problemi della malaria umana, ha permesso deduzioni importanti anche nel campo della immunità biologica. *Cannon* e *Tagliaferro*, che infettarono canarini col «*plasm. cathemerium*», hanno potuto dimostrare che il numero dei parassiti che originano da ogni schizonte ad ogni schizogonia si mantiene costante nel corso della infezione, ma che col progredire dell'infezione e specialmente nello stadio della crisi, dopo cessazione degli accessi acuti, un numero sempre maggiore di schizonti neoformati viene fagocitato dalle cellule del reticolo-endotelio. Sicchè alla fine il numero degli schizonti neoformati e quello dei parassiti fagocitati si equilibrano, il che si appalesa clinicamente nella forma della malaria latente.

Le osservazioni di *Knowles* e *Das Gupta* nella malaria quartana umana parlano del pari nello stesso senso, e infine le estese ricerche istologiche di *Tagliaferro*, che infettò delle scimmie con una specie di parassita assai simile a quello della malaria quartana umana, il «*plasmodium brasilianum*», non possono essere diversamente interpretate.

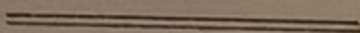
Non è però finora ben chiaro da che cosa è provocata questa maggiore attività del sistema reticolo-endoteliale. Anticorpi non furono assolutamente dimostrati nè nella malaria degli uccelli, nè nella malaria umana. Tuttavia non è escluso che essi ci siano e che non sia possibile di dimostrarli con la nostra tecnica attuale.

Si tratta in questa reazione difensiva a manifestazione cellulare di una reazione specifica di immunità, non di una stimolazione aspecifica dei macrofagi. Infatti quegli individui, che sono immuni verso una specie di parassiti malarici, possono essere ricettivi per un'altra specie (*S. P. James* e altri). Ciò ho potuto

dimostrare sperimentalmente negli uccelli con varie specie di parassiti malarici, e fu confermato anche da altri autori.

Questa reazione immunitaria è anche in rapporto colle recidive, così frequenti nella malaria, sia che col tempo la iperattività del reticolo endotelio, prodottasi per lo stimolo specifico dei parassiti, vada diminuendo, sia che lo stato di equilibrio tra parassitismo e organismo sia scosso da cause dannose di qualsiasi genere. Questa ipotesi, che è stata formulata per primo da *Ross*, ha larghe basi nella pratica e ha guadagnato sempre più terreno con le indagini di questi ultimi tempi.

Siamo tutti d'accordo nel ritenere che nella malaria si produce nell'organismo una immunità e che essa ha grande parte nella epidemiologia malarica; se così non fosse, tra il gran numero di uomini che di anno in anno ammalano di malaria, e in gran parte non sono curati, la maggior parte morrebbe.



Giudizio comparativo degli elementi ad azione chemioterapica

PROF. DR. H. SCHMIDT

Dal Laboratorio di indagini chimiche della I. G. Farbenindustrie A. G.,
Werk Elberfeld.

Lo straordinario sviluppo che hanno preso in questi ultimi decenni le nostre cognizioni sulle proprietà chemioterapiche delle sostanze fondamentali inorganiche, hanno indotto a cercare di scovare leggi generali e soprattutto i rapporti con le proprietà chimiche.

Due fenomeni risvegliarono dapprima un particolare interesse.

Da varie parti si è cercato di trovare un rapporto col « sistema periodico degli elementi », rapporto quale già da lungo tempo esiste per le proprietà farmacologiche delle sostanze fondamentali. E' certamente di grande interesse per la caratterizzazione di una sostanza fondamentale di aggiungere ai dati chimici e fisici oltre che le proprietà farmacologiche anche quelle chemioterapiche, che in parte rendono ancor più complesse le differenze, in parte danno invece a riconoscere i rapporti con l'aggruppamento chimico.

Tali considerazioni e tabelle riassuntive sono state pubblicate in questi ultimi tempi da *Walbum* ⁽¹⁾, *Levaditi* ⁽²⁾, *Kleeberg* ⁽³⁾ e in particolare da *Fischl* ⁽⁴⁾.

E' degno di nota che degli elementi chemioterapicamente attivi si trovano accumulati in singoli gruppi del sistema periodico, ad es. nel gruppo I b Cu, Ag, Au, nel gruppo V b As, Sb, Bi. Proprio il sistema periodico ha contribuito al ritrovamento e alla ricerca di nuovi effetti curativi; ricordo soltanto il pas-

(1) *Walbum*: Z. Imm.-Forschg, Bd. 42, S. 32 (1925). Bd. 47, S. 213 (1929).

(2) *Levaditi*: Compt. rend., Bd. 193, S. 404 (1931). Bd. 185, S. 91 (1927), C. r. Soc. Biol., Bd. 97, S. 167 (1927). - (Levaditi ha trovato un rapporto col comportamento elettrochimico ed analitico degli elementi da lui studiati).

(3) *J. Kleeberg*: «Klin. Wschr.» 1931, S. 509.

(4) *Fischl*: Z. angew. Chemie 1931, S. 932. Z. f. Hyg., Bd. 114, S. 284 (1932).

saggio dall'As al Sb e al Bi e le ricerche col vanadio nel reparto A. del gruppo V.

Le difficoltà di raggruppamenti come i su citati dipendono in primo luogo da ciò, che le esperienze cliniche fatte con le malattie infettive naturali e il materiale enorme desunto dal saggio sistematico delle sostanze fondamentali in varie infezioni sperimentali non sono sempre senz'altro paragonabili; ma dipendono inoltre anche da un'altra causa, e con ciò vengo al secondo fenomeno che deve essere posto a base delle presenti considerazioni. Non per tutti gli elementi si può parlare di una particolarità terapeutica, che si appalesi più o meno chiaramente in tutti i composti.

Ad es. l'azoto è caratteristico per la variabilità delle funzioni biologiche; esso nella forma elementare costituisce circa l'80% dell'aria respiratoria; nell'ammoniaca, nel protossido di azoto, nei nitriti, nei nitrati agisce sull'organismo nel modo più vario; in qualità di componente di molecole organiche più o meno complicate, negli albuminoidi, negli ormoni, nelle purine, negli alcaloidi, nelle sostanze curative sintetiche può esercitare azioni particolari assai varie, fisiologiche e terapeutiche.

Come contropartita di sostanze fondamentali, che in tutti i composti mantengono secondo il loro carattere fondamentale la loro propria funzione terapeutica, ricordo i rimedi chemioterapici mercurio e bismuto, e tra le sostanze ad azione farmacologica, il calcio.

E' notevole, che in generale è proprio dei composti metallici il fatto di conservare il carattere curativo fondamentale.

Molto adatto a considerazioni di questo genere è il già citato gruppo V b del sistema periodico, più precisamente gli elementi che si seguono uno dopo l'altro, arsenico, antimonio, bismuto, che in questi ultimi decenni si sono affermati nella terapia delle malattie infettive e sono stati studiati a fondo dal punto di vista sperimentale-chemioterapico.

Il bismuto, che come elemento e nei suoi composti ha al

massimo, tra questi tre elementi, il carattere metallico, conserva pure al massimo il suo carattere chemioterapico fondamentale in tutti i composti. Il numero dei composti chimici è, a paragone degli altri due elementi, limitato per il fatto che soltanto i composti inorganici trivalenti sono stabili e che il bismuto può dare soltanto in misura assai limitata composti col carbonio.

Il compito della sintesi di medicamenti consisteva nell'ottenere composti del bismuto, che per le loro proprietà chimiche e fisiche esercitassero l'effetto curativo di questo rimedio sulle spirochetosi, con condizioni favorevoli di assorbimento e di eliminazione, e possibilmente senza effetti accessori.

Del tutto diverse sono le condizioni per l'arsenico. Le proprietà metalliche passano in secondo piano, il numero e la varietà dei composti sono assai grandi, e anzi inesauribili per la facoltà che esso possiede di dare composti della più varia natura con molecole di carbonio.

A ciò corrisponde la variabilità delle proprietà farmacologiche e terapeutiche.

Tra i composti inorganici i sali dell'acido arsenioso e quelli dell'acido arsenico presentano differenze minime di tossicità; a scopo terapeutico vengono utilizzati, come corroboranti, soprattutto i primi.

La massima variabilità si appalesa però nei composti dell'arsenico col carbonio. D'un lato possono essere aumentati gli effetti tossici dell'arsenico, dell'idrogeno arsenicale, del tricloruro di arsenico fino agli effetti distruttivi di un gas di guerra, d'altro lato la diminuzione della tossicità che è raggiunta nell'acido arsenico può scendere fino all'atossicità negli acidi arsinici alifatici (cacodilati, Solarson e altri), pure mantenendosi l'effetto corroborante.

La funzione più importante è quella chemioterapica. La scoperta di *Uhlenhuth* della guaribilità delle spirochetosi sperimentali coll'atoxyl, e poi l'aumento e la specificazione di questa funzione nel Salvarsan ottenuto da *Ehrlich*, dimostrarono l'esi-

stenza di un'azione così particolare, che in paragone l'uso da lungo tempo noto sempre ripreso e da ultimo quasi dimenticato di impiegare preparati inorganici di arsenico, di acido arsenioso, di trisolfuro di arsenico ecc. per la cura della lue, perdette di valore ⁽¹⁾.

Mai si sarebbe potuto sospettare che la debole azione antiluetica presente nell'acido arsenioso, azione tentata per mezzo di fumigazioni, applicazioni esterne, somministrazione orale, potesse essere portata a un così alto livello con la sintesi di medicinali. La scoperta dell'effetto curativo sulla lue del Salvarsan fu quindi a buon diritto considerata come una scoperta genuina, importante tanto per le sue applicazioni pratiche dirette quanto per le direttive che ha segnate per le indagini ulteriori.

E' tuttavia per i nostri scopi importante di ricordare che il carattere fondamentale spetta, se pure debolmente, all'arsenico nei suoi composti semplici inorganici e che l'effetto del Salvarsan, dello Spirocid ecc., la variabilità e la specificabilità dell'azione dell'arsenico mediante sostituenti del nucleo benzolico vanno considerati come un aumento, una modificazione, una specificazione dell'azione debolmente antiluetica presente nella sostanza fondamentale. Lo stesso vale per gli effetti tripanocidi ed altri.

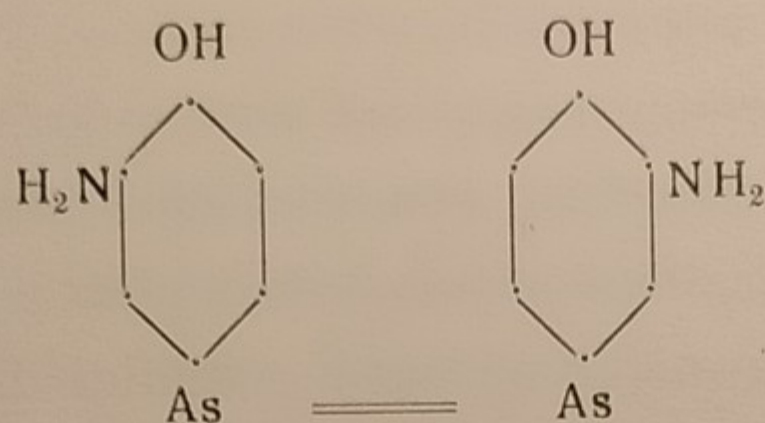
Ciò può essere considerato come un parallelo con certe proprietà chimiche.

La parte carbonio, la parte "organica,, della molecola, ha importanza predominante per l'habitus dei composti mono-arilar-sinici, [soltanto questi hanno importanza pratica per la terapia ⁽²⁾], tanto per le proprietà fisiche quanto per quelle chimiche. L'arsenico elementare insolubile, nella sua modificazione dall'aspetto

(1) E. Baader. - L'arsenoterapia della sifilide fino all'era Salvarsanica. *Inaug. Diss.*, Berlino, 1918. Conf. anche Schlossberger in *Kolle-Zieler «Handbuch der Salvarsantherapie»*.

(2) Nei composti di- e triarilar-sinici, nei quali l'arsenico è legato a 2 o 3 nuclei benzolici, la prevalenza del carattere organico è naturalmente ancora più spiccata. Tuttavia in questi composti l'azione chemioterapica è molto più scarsa.

metallico, legato a due nuclei benzolici sostituiti ⁽¹⁾ nella base Salvarsan, prende parte alle proprietà che i sostituenti del nucleo benzolico impartono alla molecola: solubilità negli alcali e negli acidi, ricettività per influenze chimiche (chemiocettori).

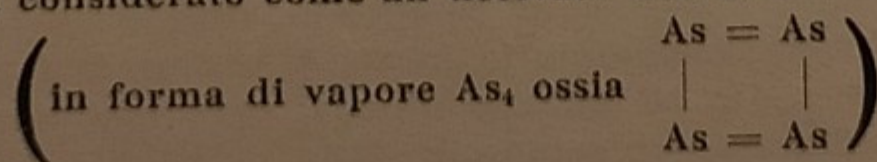


Le possibilità che derivano con ciò per la sintesi di medicinali, vengono completate dalla modificabilità dei radicali inorganici ($-\text{AsO}_3\text{H}_2$, $-\text{As}=\text{As}-$, $-\text{AsO}$ ecc.) con i loro noti effetti chemioterapici.

L'antimonio tiene un posto a mezzo tra l'arsenico e il bismuto. Le proprietà metalliche di questo elemento e dei suoi composti sono molto più spiccate che nell'arsenico, il numero dei suoi composti è simile a quello dell'arsenico. Dall'arsenico si distingue per la natura colloidale dei suoi composti con l'ossigeno, per la loro insolubilità in acqua, e in ciò assomiglia al bismuto, dal quale si distingue a sua volta per la stabilità dei composti pentavalenti.

Il carattere chemioterapico fondamentale è nell'antimonio assai più spiccato che nell'arsenico, già nei suoi composti inorganici. La proprietà tripanocida può essere chiaramente dimostrata nel topo infettato coll'antimonio metallico finemente suddiviso, col triossido di antimonio per via parenterale. Meglio adatto di questi composti insolubili è un sale solubile in acqua. Siccome l'antimonio trivalente non forma un sale solubile in acqua corrispondente all'arsenito di sodio, dapprima non si po-

(1) Il Salvarsan va considerato come un derivato dell'arsenico elementare



come gli acidi arsinici aromatici: $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{AsO}_3\text{H}_2$ vanno considerati come derivati dell'acido arsenico AsH_4O_3 ecc.

teva usare che il tartrato acido di potassio [tartaro stibiato ⁽¹⁾], col quale fu in un primo tempo dimostrata l'azione tripanocida dell'antimonio. Nella forma di questo sale complesso l'antimonio trivalente ha, come è noto, trovato larga applicazione nelle malattie infettive delle regioni tropicali.

Una netta differenza esiste tra antimonio tri- e pentavalente nella tossicità e nell'azione vomitiva (*Brunner*).

Notevole che l'azione tripanocida spetta nelle esperienze sugli animali soltanto ai composti inorganici di antimonio trivalente, e manca invece nei composti inorganici dell'antimonio pentavalente (*Kolle, Bock*), ossia che esiste differenza spiccata tra le due tappe di ossidazione.

Passando a parlare dei composti organici dell'antimonio, troviamo tutta una serie di possibilità di variazioni, assai prossime a quelle dell'arsenico.

Una distinzione esiste per il fatto, che l'affinità chimica dell'antimonio per il carbonio non è forse così grande come quella dell'arsenico, sicchè qualche composto per se stesso interessante come ad es. il diossidiamidostibiobenzolo, l'analogo del Salvarsan, non è sufficientemente stabile per poter essere usato in terapeutica.

Inoltre i composti organici di antimonio si distinguono essenzialmente dai composti organici di arsenico per il fatto, che la parte inorganica della molecola nei composti monoarilanti-

(1) Questo composto dell'ossido di antimonio con l'acido tartarico non viene considerato nel senso chimico come un composto «organico». L'antimonio è qui legato alla molecola organica per il tramite dell'O (Conf. *Schmidt*, Z. angew. Chemie 1930, p. 965). Composti organici di antimonio nel senso chimico sono quelli nei quali l'antimonio è direttamente legato al carbonio, ad es. acido fenilstibinico $C_6H_5 \cdot SbO_3H_2$ o più esattamente $C_6H_5 \cdot SbO_2 \cdot nH_2O$.

La dicitura chimica si differenzia qui da quella medica, che parla di ferro, calcio, fosforo organicamente legato quando si tratta di legatura salina o di complessi con composti organici, ma non della legatura degli elementi al carbonio.

Nei composti complessi le singole reazioni dell'antimonio sono più o meno mascherate secondo il grado della legatura del complesso; invece è conservata la precipitazione per opera dell'idrogeno solforato in forma di solfuro di antimonio rosso. Ma l'acido fenilstibinico (similmente ad es. allo Stibenyl ecc.) non viene scomposto dall'idrogeno solforato, bensì forma un composto giallo.

In tal guisa il modo di comportarsi verso l'idrogeno solforato costituisce una reazione differenziale caratteristica tra composti di antimonio inorganici e organici.

moniali, i soli utilizzabili a scopi terapeutici, ad es. negli acidi stibinici aromatici il radicale $-SbO_3H_2$ determina essenzialmente il carattere chimico di tutta la molecola con le sue proprietà colloidale-chimiche, mentre i composti organici arsenicali assomigliano più o meno a composti organici.

Talune simiglianze si possono riconoscere nel comportamento biologico dei composti antimoniali aromatici.

Come nei composti organici di arsenico, anche qui si può influire sulla tossicità; ad es. taluni composti trivalenti di antimonio e carbonio possono esplicare un'azione irritativa simile a quella dei gas arsenicali di guerra; e d'altra parte la tossicità ad es. degli acidi arilstibinici con antimonio pentavalente può essere fortemente influenzata da sostituenti benzolici.

La efficacia può essere nei composti organici di antimonio modificata qualitativamente e quantitativamente (*Uhlenhuth, Kuhn e Schmidt*).

Tuttavia, mentre le differenze chemioterapiche tra i singoli acidi arsinici aromatici sono esclusivamente legate ai sostituenti benzolici, e il radicale $-AsO_3H_2$ rimane uguale, negli acidi stibinici aromatici e nei loro sali può avere importanza anche la disposizione del radicale dell'acido stibinico.

Nel p.-amminofenilstibiato di dietilammina (Neostibosan) l'aumento massimo dell'effetto sul Kala-azar (presente anche nel tartaro stibiato), il favorevole rapporto tra efficacia e tossicità va ascritto al radicale p.-amminofenilico, ma anche alla disposizione colloidale-chimica del radicale dell'acido antimonico nel sale di dietilammina.

E' risultato che i preparati organici antimoniali pentavalenti, come il Neostibosan e i suoi predecessori Stibenyl e Stibosan, non possono sostituire in altre malattie, come il Kala-azar, l'antimonio trivalente, quale è presente nel tartaro stibiato.

Il quesito di trovare per questa indicazione una forma più appropriata di somministrazione per l'antimonio, fu pertanto risolto in modo diverso che per il Kala-azar. La causa delle

manchevolezze del tartaro stibiato fu riconosciuta essere nella incompletezza della legatura dei complessi. Rafforzando la legatura dei complessi si ottenne l'Antimosan e la Fuadina (Neo-Antimosan). Notevole che col rafforzamento della legatura dei complessi (1) si ottenne negli esperimenti sugli animali una notevole detossicazione e con ciò aumento dell'indice chemioterapico, quale è ottenibile dall'arsenico soltanto nei suoi composti col carbonio (*Uhlenhuth, Kuhn e Schmidt*).

Dopo di avere esposto quali variazioni dell'effetto si abbiano nei composti dei tre elementi, possiamo confrontare gli effetti chemioterapici. Data la massa di materiale clinico e sperimentale è soltanto possibile di far rilevare alcuni fatti importanti per il nostro tema.

Malattie da protozoi: Nelle spirochetosi hanno effetto tutti i tre elementi.

Per l'arsenico esso è appena accennato nei composti inorganici, nel Salvarsan e derivati e nello Spirocid esso è aumentato al massimo; nel bismuto, come si disse, esiste già in composti semplici, se essi sono assorbibili.

È interessante che l'antimonio, uno dei principali rimedi della lue che siano stati usati nel Medio-evo, non ha potuto finora affermarsi, di fronte al Salvarsan e al bismuto, nello sviluppo recente della metalloterapia delle spirochetosi.

Che un effetto sia presente anche nei composti semplici inorganici è stato dimostrato per varie indicazioni; così per la sifilide (*Salmon*) e per la framboesia (*Dye*). L'effetto può essere aumentato in certi composti organici, ad es. nello Stibosan: spirillosi dei polli, sifilide dei conigli (*Uhlenhuth* 2) febbre ricorrente e sodoku (*Schochaerd*).

(1) Conf. *Arch. f. Schiffs-und Tropenhygiene*, 1931, fasc. 2. L'acido pirocatechindisulfonico, il formatore di complessi usato nella Fuadina ha fatto buona prova anche per la preparazione di sali complessi di altri metalli che in soluzione sono di reazione neutra. Il calciopirocatechindisulfonato di calcio e sodio, recentemente introdotto in terapia da *Weese e Seyderhelm* col nome di Selvadin, è un sale di calcio iniettabile, non irritante.

(2) *Uhlenhuth e Selffert* hanno pubblicato in *Klin. Woch.*, 1931, p. 1751 un lavoro riassuntivo sui vari preparati antimoniali e relative indicazioni. - Confr. anche la *Rivista sulla terapia antimoniale e arsenicale* in *Klin. Woch.*, 1931, p. 1153.

Tutti tre gli elementi sono attivi anche nelle tripanosi. *Schnitzer* ha riferito dell'azione tripanocida di nuovi composti di bismuto solubili in acqua. Per l'arsenico l'effetto esiste bensì nei composti organici, ma è debole; sviluppato in modo specifico nei composti organici, come l'atoxil, il tryparsamide e altri. Riguardo all'antimonio hanno già effetto spiccato i composti inorganici trivalenti e quelli complessi. Nei composti organici di antimonio pentavalente, l'effetto è, negli esperimenti sugli animali, modificabile secondo i sostituenti del benzolo, ad es. aumentato (come nello Stibosan), talvolta diminuito fino quasi a zero (come nel Neostibosan).

Nelle tripanosi le condizioni sono straordinariamente complicate per la grande differenza di reazione ai rimedi che le varie specie di tripanosomi presentano, differenza che aumenta ancora secondo l'ospite, per le molte divergenze tra esperimenti sugli animali e pratica clinica ecc.

Delle tre sostanze soltanto l'arsenico e l'antimonio hanno trovato applicazioni pratiche. Nella lotta contro i tripanosomi dell'uomo e degli animali i preparati metallici hanno trovato un forte concorrente nel Bayer 205. Oltre al Bayer 205 si usano contro la malattia del sonno umana l'atoxil e il tryparsamid; i preparati di antimonio soltanto in sottordine.

Un'azione specifica spiccata ha l'antimonio trivalente (tartaro stibiato, recentemente l'Antimosan) nella malattia tsetse dei bovini del Sud-Africa (*Curson, Du Toit, Hornby, Parkin*) provocata dal tripanosoma congolense e vivax, e ciò corrispondentemente all'azione che esso svolge nel topo infettato di tripanosoma congolense (*Röhl*). Nelle altre tripanosi animali, come il nagana, la durina e il mal di caderas dei cavalli, si usa l'Antimosan vet. in combinazione col Bayer 205.

Nel Kala-azar (leishmaniosi interna) l'antimonio esercita azione specifica già nei suoi composti inorganici e complessi, mentre i preparati di arsenico sono inefficaci e il bismuto ha soltanto azione minima.

L'effetto dell'antimonio è aumentato in determinati acidi stibinici aromatici, aumentato al massimo nel Neostibosan (*Napier, Röhl*), e in pari tempo reso nettamente specifico (inefficace nelle tripanosi e nelle spirochetosi sperimentali, insufficientemente attivo nella bilharziosi).

Leishmaniosi cutanea: Anche in questa malattia nella quale l'effetto dell'antimonio sul parassita fu per primo constatato da *Vianna* nel 1913, l'antimonio ha il primo posto fra le tre sostanze in discussione. Tuttavia la leishmaniosi cutanea - che specialmente nella sua forma asiatica reagisce anche ad altri medicinali - non reagisce all'antimonio in modo così strettamente specifico come la leishmaniosi interna. Una difficoltà nel giudicare l'effetto sta in ciò, che specialmente il bottone d'Oriente asiatico è talvolta refrattario verso rimedi determinati, forse per la coesistenza di infezioni miste.

Alcuni autori ritengono efficaci i preparati salvarsanici.

Nella Espundia brasiliana l'antimonio, più precisamente nella forma trivalente (Fuadina), ha indiscutibilmente l'effetto massimo.

Anche nel bottone di oriente asiatico è preferito l'antimonio trivalente. Tuttavia in entrambe le malattie sono stati ottenuti buoni risultati anche coi preparati antimoniali pentavalenti.

Malaria: Tra i vari derivati arsenicali sperimentati si sono dimostrati efficaci nella terzana il Salvarsan (*Werner* e altri), lo Stovarsol (Spirocid) e il chinino-stovarsol (*Valenti* e *Tomaselli, Marchoux* e *Fourneau*).

L'effetto dei preparati antimoniali è sub judice; a taluni risultati positivi, anche in casi chinino - resistenti fanno, contrapposto reperti negativi.

Nelle *piroplasmosi* si usano preparati salvarsanici. Nelle *theileriosi* si è trovato che è efficace l'Antimosan (*Freund, Velu* e *Zottner*). Nelle *anaplasmosi* è stata raccomandata una cura combinata di preparati arsenicali e antimoniali (*Färber*).

Le condizioni sono qui simili a quelle delle tripanosi, per la varietà dei germi e la varia reattività ai rimedi.

Nella *ematuria dei bovini*, provocata da coccidi, è efficace l'antimonio (*Schärrer*).

Elmintiasi: Nella *bilharziosi* (bilharziosi vescicale, intestinale e giapponese, anche bilharziosi animali), l'efficacia massima hanno i preparati antimoniali trivalenti (*Fuadina*), mentre l'efficacia dei preparati antimoniali organici pentavalenti è minore (*Khalil* e altri).

Il bismuto e i composti arsenicali hanno un'azione minima e neppure da tutti ammessa.

Nella opistorchiasi dei gatti fu constatata un'efficacia specifica dell'antimonio (*Fuadina*, tartaro stibiato). I preparati antimoniali pentavalenti (*Neostibosan*) non hanno effetto (*Ehrhardt*).

Una stessa limitazione della efficacia dell'antimonio esiste per la sclerostomiasi dei cavalli (*Richter*).

In altre verminosi, come la clonorchiasi, la paragonimiasi, le distomiosi epatiche degli animali, sembrano esistere condizioni simili, ossia una posizione a sé dell'antimonio; tuttavia le cose non sono qui ancora del tutto chiare. Nella trichinosi sono efficaci il tartaro stibiato e la *Fuadina* (*Grove, Beckmann*).

Tra le varie filariosi, un effetto sicuro dovrebbe avere l'antimonio nella filariosi dei cani, un effetto più debole, forse non specifico, lo stesso antimonio nelle filariosi umane.

Malattie batteriche: In questo campo sono noti gli effetti tanto dell'arsenico quanto dell'antimonio che in alcuni casi possono essere considerati come specifici.

Ciò vale soprattutto per il mal rossino sperimentale del topo, nel quale alcuni derivati del Salvarsan hanno un effetto spiccato, mentre il tartaro stibiato è senza effetto (*Kolle e Schlossberger*).

Colebrook ha studiato sperimentalmente alcuni effetti degli arsenobenzoli sugli streptococchi.

Ricordiamo anche l'uso del Salvarsan nel carbonchio e in alcune malattie settiche degli animali.

L'antimonio ha azione specifica nel granuloma venereo e nel rinoscleroma, che hanno una certa parentela riguardo al germe

(bacillo capsulato)⁽¹⁾. In entrambe le malattie sono già efficaci i composti inorganici o complessi, tuttavia si preferisce in entrambi i casi il Neostibosan.

Sull'effetto delle tre sostanze nella febbre di Malta non è stato finora riferito nulla di definitivo.

L'uso dell'antimonio come coadiuvante di altri rimedi nella lebbra non si basa forse su un'azione specifica.

Forse ciò vale anche per le osservazioni sugli effetti curativi dell'antimonio nella tubercolosi (*Moxey, Josa, Wichmann*). Anche coi preparati di bismuto sono stati ottenuti dei risultati. Nel pemfigo cronico contagioso, *Leber* trovò efficace lo Stibenyl.

Malattie infettive da virus ultravisibili: Un'azione specifica va riconosciuta al Salvarsan nella mastite epidemica delle cavalle.

I preparati antimoniali in genere, senza che finora alcuno di essi si sia particolarmente affermato, sono efficaci, contrariamente all'arsenico e al bismuto, nel bubbone climatico (linfogranchioma inguinale subacuta). Nella poliomielite sperimentale delle scimmie hanno dimostrato di essere efficaci, fra le tre sostanze, soltanto i preparati arsenicali (*Jungeblut*).

Micosi: I preparati di antimonio (tartaro stibiato, Antimosan vet.) hanno un'azione specifica sicura nel granuloma nasale dei bovini, malattia diffusa in India (*Rai Sahib e G. N. Roy Chauduri*). Questa malattia è provocata, come l'actinomicosi, da un actinomicete ⁽²⁾. Nella rinosporidiosi, *Wright* trovò efficace il tartaro stibiato. I preparati salvarsanici trovano applicazione come rimedi specifici nella linfangite epizootica; è efficace anche l'antimonio (*Alessandrini*).

Anemia da bartonella: In questa infezione sperimentale dei ratti si sono ottenuti in questi ultimi anni risultati interessanti colle tre sostanze in questione. Sono efficaci, secondo *Mayer, Bor-*

(1) Confr. *Martin-Meyer* « Med. Klin. » 1922, n. 17 e 18.

(2) In una pubblicazione molto recente *Datta* combatte questa opinione e distingue tra granuloma nasale provocato da schistosomi e rinosporidiosi clinicamente simile del bue. L'azione specifica dell'antimonio si esplicherebbe soprattutto nella prima malattia.

chardt e *Kikuth*, i composti arsenicali, soprattutto nella forma di composti organici - Salvarsan tra altri - che secondo *Kikuth* sono efficaci anche nella bartonella canis. Il bismuto e i composti inorganici di antimonio sono inattivi.

Taluni composti organici di antimonio (Stibenyl, Stibosan) hanno un certo effetto, che per altro è assai inferiore a quello del Salvarsan; il Neostibosan è inattivo (*Yoshiwhara*).

Alcuni composti arseno-antimoniali Salvarsan - simili hanno, secondo *Uhlenhuth* e *Seiffert* (l. c.) un effetto superiore a quello dei preparati di Salvarsan. Gli stessi composti ebbero nella ricorrente un effetto un po' maggiore, ma risultarono di effetto insufficiente nelle spirochetosi e nelle tripanosi.

Riassumendo, si deve far rilevare la frequenza di proprietà chemioterapiche nei tre elementi del gruppo V b. Queste proprietà sono più proteiformi nell'arsenico e nell'antimonio che nel bismuto, più che tutto nell'antimonio. Accanto a nette differenze qualitative, si constatano indicazioni comuni (spirochetosi e tripanosi). L'effetto potè finora venire modificato qualitativamente e quantitativamente nei composti dei tre elementi, con una graduatoria progressiva, che dal bismuto per l'antimonio giunge all'arsenico. Si possono constatare rapporti tra effetto e varianti chimiche.

Acquisizioni recenti nel campo della tecnica istologica

PROF. DR. G. DOMAGK

Dall'Istituto di Patologia sperimentale della I. G. Farbenindustrie A. G.
Werk Elberfeld.

Mentre in tempi meno recenti si era costretti a esaminare sotto al microscopio in preparati per dilacerazione non colorati o in sezioni fatte col rasoio le alterazioni tessurali più fini, lo studioso ha attualmente a disposizione metodi assai migliorati e molto più semplici. Abbiamo attualmente dispositivi ottici di gran lunga migliori, possediamo attualmente dei microtomi che permettono di preparare dai tessuti freschi o fissati sezioni di spessore di pochi γ . Sono stati trovati molti metodi di indurimento e di fissazione per preservare i tessuti da esaminare dall'autolisi e dalla putrefazione e per ottenere un optimum di sezionabilità. Conosciamo metodi per includere in gelatina, paraffina e celloidina tessuti delicati e friabili.

Con ciò riusciamo a mettere in evidenza insieme ai tessuti confinanti anche, ad es., parti necrotiche di tessuti, che se fossero sezionati in un materiale non incluso andrebbero disperse. Sono state trovate molte colorazioni che ci permettono di riconoscere meglio che in passato particolarità e dettagli delle cellule. Tuttavia non dobbiamo dimenticare quanti preziosi reperti siano stati rilevati dagli studiosi più antichi coi metodi più semplici. In molti casi non rinunciamo neppure oggi all'esame di sezioni fresche, non fissate e non colorate. D'altra parte nessun studioso lavorerà oggi senza il sussidio dei preziosi metodi istologici di colorazione, che gli permettono ad es. di riconoscere finissime alterazioni nucleari nella cellula, alterazioni che non si sarebbero potute riconoscere nella sezione a fresco, oppure di raffigurare elettivamente inclusioni, come grasso, glicogeno, calcio, ferro ecc. nelle cellule stesse.

Tuttavia è assolutamente necessario che usando i metodi di

colorazione delle cellule fissate si rispettino certe regole. La fissazione delle cellule deve essere fatta subito dopo la presa onde evitare quanto è possibile fenomeni disturbanti di autolisi; inoltre le particelle di organi non devono essere troppo grosse, onde siano dovunque bagnate dal liquido di fissazione e questo possa penetrarvi. I pezzi grossi devono essere resi accessibili al liquido di fissazione mediante tagli; gli organi interi, ad es. i polmoni, il cervello, è bene iniettarli dapprima col liquido di fissazione facendolo passare per i vasi; poi li si mettono nel liquido di fissazione. Il fissante più in uso è attualmente il formolo. Nella maggior parte dei casi basta per gli esami abituali la fissazione in formolo al 4-10%. Tuttavia anche il formolo, questo fissante che è in genere un fissante ideale, ha dei difetti, che si fanno sentire specialmente quando si tratta di giudicare le strutture cellulari più fini. Colla fissazione si vuole conservare una condizione formale che si avvicini quanto più possibile a quella della cellula viva; pertanto non deve prodursi una tumefazione o un raggrinzamento troppo spiccato della cellula fissata. Questa ragione spiega gli sforzi fatti molto recentemente per migliorare i metodi di fissazione esistenti. Si dovrebbero evitare gli indesiderati raggrinzamenti e gonfiamenti, conseguenza dell'acidificazione del liquido di fissazione, si dovrebbe ottenere un pH sempre uniforme della soluzione, che fosse vicino a quello del sangue, inoltre la isotonia della soluzione stessa. Il liquido di fissazione che finora risponde nel modo migliore a questi desiderata è quello recentemente indicato da *W. Gross e Lohaus* (*Z. f. w. Mikr. Bd. 49, 1932*).

Si eviteranno per quanto è possibile i procedimenti di inclusione che non siano necessari. Con un buon microtomo a refrigerazione si possono ottenere, con un po' di esercizio, buoni risultati nella maggior parte dei tessuti. Si evitano in tal caso ulteriori raggrinzamenti in paraffina ecc.; tuttavia i metodi di inclusione non possono essere abbandonati in tutti i casi; ad es. per l'esame istologico del cervello, delle ossa, degli occhi, non

si può fare a meno della inclusione in celloidina. Crediamo di avere ottenuto un perfezionamento di questo metodo colla introduzione del «Cedukol», un preparato confezionato in comode scatole di alluminio, che senza previo essiccamento - come si usa fare in generale colla celloidina - può essere sciolto senz'altro in etere, alcool.

La soluzione I, tenue, viene preparata sciogliendo 10 gr. di cedukol in una miscela di 50 cc. di etere o 50 cc. di alcool etilico assoluto; la soluzione II, spessa, sciogliendo 15 gr. di cedukol in una miscela di 15 cc. di etere e 15 cc. di alcool etilico assoluto. Ad es. includiamo pezzetti di cervello per la colorazione di *Nissl* nel modo seguente: Fissazione in alcool etilico a 96 %, disidratazione in alcool assoluto ripetutamente cambiato. Dopo 24 ore di soggiorno in etere-alcool i pezzetti vengono poi posti per circa 8 giorni nella soluzione I, indi per circa 8-14 giorni nella soluzione II, e vengono poi messi in blocchetti su legno o stabilit. Onde evitare un essiccamento troppo rapido, si fa avvenire la solidificazione sotto una campana di vetro fino alla consistenza desiderata; nella campana c'è una piccola capsula con cloroformio. I blocchetti pronti vengono conservati in etere-alcool al 70 %.

Per ottenere risultati di colorazione ineccepibili nelle sezioni istologiche, si deve già nella fissazione e nella inclusione attenersi strettamente a certe norme; inoltre si devono, come si capisce, seguire strettamente le regole fissate per i metodi di colorazione. Soltanto in tal modo si ottengono in ogni caso quadri reciprocamente bene paragonabili, o, come *Nissl* ha detto in modo felice, sempre lo stesso quadro equivalente della cellula vivente.

La condizione più importante per ottenere un risultato fidato della colorazione è però sempre questa: usare gli stessi materiali di colorazione. Finora purtroppo questa condizione non poté essere rispettata. Quasi tutti i coloranti preparati dall'industria chimica hanno per iscopo la colorazione delle sostanze tessili o qualche altra applicazione tecnica, ma non corrispondono ai requisiti delle indagini scientifiche. La composizione della sostanza colorante non è sempre uniforme; inoltre i colori sono soggetti alla moda e vengono nel corso del tempo sostituiti da altri, tenendo per postulato di migliorare la resistenza, la uniformità ecc. Tutte questioni che interessano lo specialista tessile, non il medico e il biologo.

Tali essendo le condizioni, si dovettero spesso mettere seriamente in dubbio la fidatezza e le possibilità di confronto dei risultati ottenuti coi metodi istologici abituali. Meglio non precisare quanti errori scientifici e quante discussioni siano state possibili per queste insufficienze della metodica finora in vigore.

Per semplificare e standardizzare le sostanze coloranti usate per scopi scientifici abbiamo pertanto scelto e standardizzato delle sostanze coloranti (1) che nei nostri laboratori risultarono particolarmente adatte per scopi microscopici.

Il numero dei metodi di colorazione raccomandato per scopi istologici è divenuto a poco a poco sconfinato. Per le più importanti colorazioni furono cercati coloranti appropriati. Inoltre nei nostri Laboratori noi abbiamo elaborato una serie di metodi perfezionati di colorazione.

I metodi più importanti attualmente usati per la tecnica istologica sono le colorazioni nucleari per lo più in combinazione con una colorazione di contrasto del protoplasma, nonché del sangue; inoltre i metodi per mettere in rilievo il tessuto connettivo e il grasso. In pratica basta in generale un numero assai piccolo di buone colorazioni, ma queste devono essere almeno di assoluta fiducia.

Uno dei compiti più importanti della tecnica istologica è quello di ottenere colorazioni nucleari ben nette, resistenti alla luce e ai fattori riduttori. Il merito principale spetta in questo campo a *Becher* che ha studiato gran numero di sostanze coloranti da questo punto di vista. Tuttavia nel campo della istologia pratica le nuove colorazioni ideate da *Becher* non hanno potuto finora prendere piede soprattutto perchè non possono essere praticate così rapidamente come le colorazioni con ematossilina e carminio. Queste due sostanze coloranti naturali finora non avevano potuto essere sostituite nella pratica istologica dai coloranti sintetici migliori.

(1) Le sostanze coloranti vengono poste in commercio come sostanze coloranti standardizzate « *Bayer-Meister Lucius* » dalla ditta *Dott. Karl Hollborn e Söhne* di Lipsia.

Nel corso delle nostre ricerche noi siamo riusciti a trovare nella serie antrachinonica una sostanza colorante rossa assolutamente resistente alla luce, che è di gran lunga superiore al carminio per forza di colore e di brillante e che dà in tempo brevissimo una colorazione eccellente dei nuclei. Ottimi risultati di colorazione con questa nuova sostanza colorante rossa, rosso fisso per nuclei (Kernechtrot) si ottengono anche colla colorazione ferrica, quella di *Gram*, la colorazione del connettivo di *Mallory*, quella delle fibre elastiche ecc.

Siccome i nuclei delle cellule giovani e le mitosi si designano col rosso fisso per nuclei con colorazione particolarmente rossa brillante, questo colorante ha reso servizi particolarmente buoni per la diagnosi dei tumori. Il rapporto tra nucleo e protoplasma si appalesa in modo ben chiaro.

Combinando la colorazione nucleare con una colorazione turchina del plasma, si vedono ad es. in un carcinoma del retto (fig. 1) gli epiteli normali della mucosa colorati in turchino coi piccoli nuclei rossi; nell'impressione complessiva della mucosa normale prevale il turchino. Invece nel carcinoma proliferante gli epiteli risultano - perchè i grossi nuclei spiccano fortemente - in complesso rossi, il sottile orlo protoplasmatico passa affatto in seconda linea. A debole ingrandimento i nidi di Ca appaiono quindi in contrapposto alla mucosa normale, turchina, intensamente rossi.

Le norme per le più importanti colorazioni combinate con rosso per nuclei sono le seguenti:

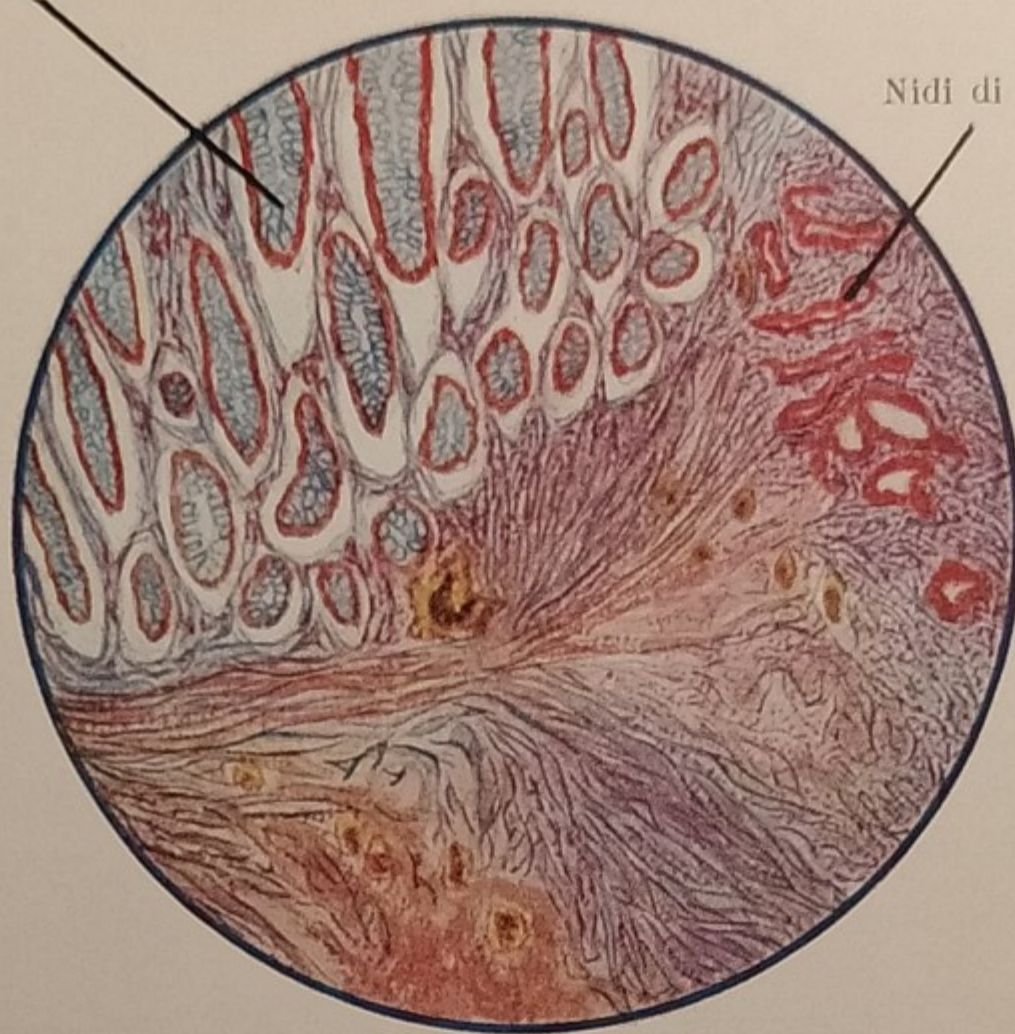
1. Colorazione dei nuclei: Fissazione in formolo o altri liquidi fissanti, nel modo migliore in soluzione di sublimato in alcool.

Preparazione della soluzione colorante: gr. 0,10 di rosso fisso per nuclei vengono sciolti a caldo in 100 cc. di soluzione acquosa al 5% di solfato di alluminio. La soluzione viene filtrata dopo che si è raffreddata.

Le sezioni vengono collocate per 1 - 5 minuti in questa soluzione colorante ed indi dilavate in acqua distillata. Disidratazione in alcool, xilolo, balsamo. Dopo la colorazione nucleare eventuale colorazione di contrasto con bleu di anilina, bleu di anilina-orange ecc.

2. Colorazione dei nuclei in combinazione con la colorazione ferrica. Le sezioni

Mucosa intestinale
normale

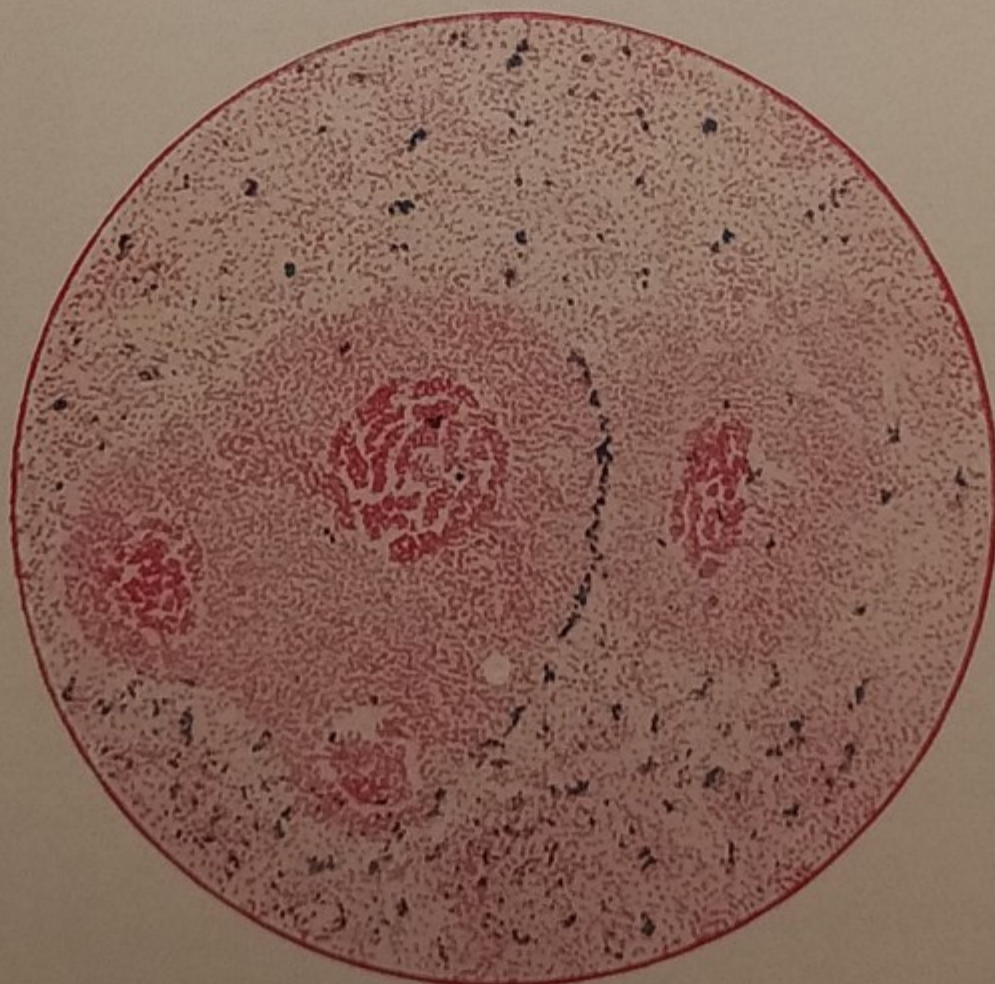


Nidi di Ca.

1

Adenocarcinoma del retto

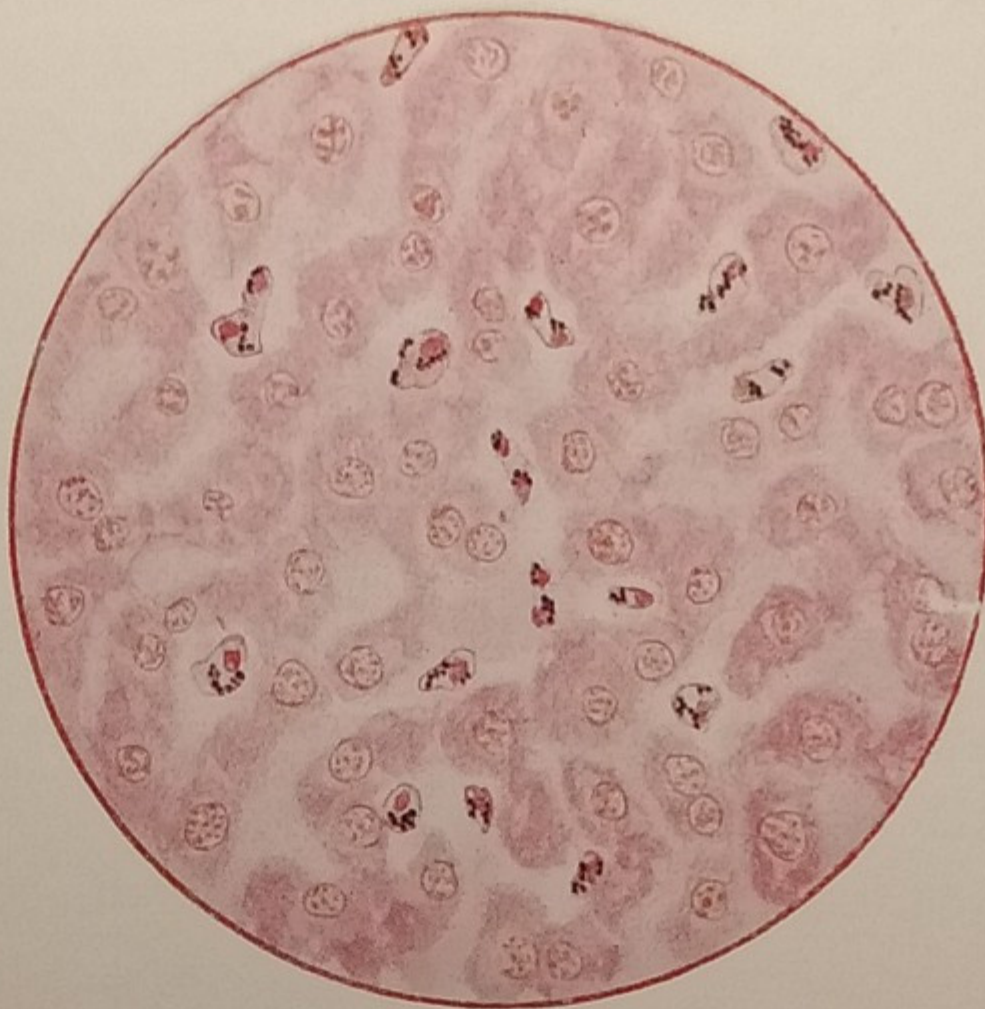
*Colorazione dei nuclei con rosso fisso per nuclei (Kernechtrot)
Colorazione di contrasto con bleu di anilina-arancio*



2

Emosiderina nella milza dei ratti

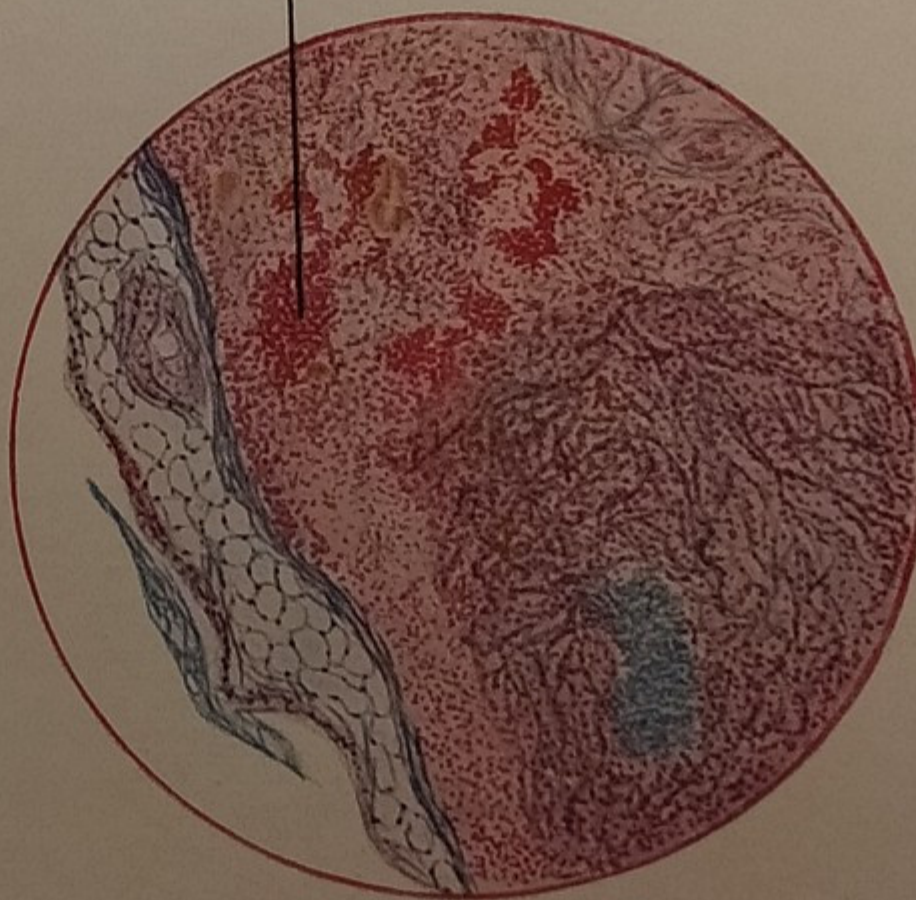
*Colorazione dei nuclei con rosso fisso per nuclei
e reazione al bleu di Berlino*



3 Fagocitosi di stafilococchi nelle cellule stellate di Kupffer del fegato (Topo infettato)

Colorazione di Gram - Rosso fisso per nuclei

Resti di follicoli



4 Glandola linfatica tubercolare di cavia

Colorazione Mallory. Colorazione dei nuclei con rosso fisso per nuclei. I follicoli ancora conservati addimostrano nuclei intensamente rossi, il focolaio tubercolare sclerotico nel mezzo, per rimanente occupato da tessuto connettivo colorato in turchino

dopo essere state tenute per 12 ore in solfuro di ammonio di recente preparazione e poi dilavate, vengono portate in una soluzione di ferrocianuro potassico al 20 % e acido cloridrico a 1 % in parti uguali. Altra lavatura a fondo. Colorazione successiva dei nuclei con soluzione a 0,10 % di rosso fisso per nuclei. Durata della colorazione circa 1 - 5 minuti. Indi lavare in acqua distillata, disidratare le sezioni in alcool, xilolo, balsamo (v. fig. 2).

3. Combinazione della colorazione nucleare con rosso fisso per nuclei e colorazione di Gram: Previa colorazione delle sezioni per 5 - 10 minuti nella soluzione a 0,10 % di rosso fisso in solfato di alluminio. Lavare le sezioni in acqua distillata, colorazione per 5 minuti in acqua di anilina - violetto di metile o acqua fenicata-violetto di metile, lavatura delle sezioni in acqua distillata. Dopo essiccamento delle sezioni, soluzione di *Lugol* per 3 minuti, di nuovo asciugare con carta di filtro. Differenziare in anilina. Nelle sezioni ben differenziate i batteri Gram sono colorati in turchino-nero, i nuclei in rosso (v. fig. 3). Le sezioni differenziate vengono poste in xilolo fresco che va cambiato parecchie volte e incluse in balsamo o caedax.

4. Colorazione con rosso fisso dei nuclei cellulari in combinazione con la colorazione di Mallory (v. fig. 4 e 5): Colorazione per circa 5 minuti dei nuclei in soluzione di rosso fisso, breve lavatura in acqua distillata e fissazione della colorazione per 5 minuti in soluzione acquosa a 1 % di acido fosfomolibdico, lavare in acqua distillata e colorare per 2 minuti in:

Bleu di anilina	gr. 0,50
Arancio G.	gr. 2
Acido ossalico	gr. 2
Acqua dist.	100 cc., bollita, raffreddata, filtrata.

Lavare in acqua distillata, differenziazione in alcool al 96 %, alcool ass., xilolo, balsamo.

Per la colorazione del tessuto connettivo secondo *Mallory* con rosso fisso come colorante dei nuclei, la ditta *Hollborn e Söhne* mette in commercio una miscela colorante assai facilmente maneggiabile, *Kernechtrot - Kombination «H»*, con la quale con grande facilità e rapidità si può ottenere una bella colorazione del connettivo con buona colorazione dei nuclei. Le sezioni, congelate e in paraffina, vengono colorate per 20 - 30 minuti nella seguente soluzione colorante: 2 gr. di *Kernechtrot - Kombination «H»* sciolti in 100 cc. di acqua distillata calda. (Filtrare la soluzione dopo raffreddamento).

5. Colorazione col rosso fisso dei nuclei cellulari in combinazione con la colorazione delle fibre elastiche.

Le sezioni congelate vengono colorate per 5 minuti, quelle in paraffina per 10 - 15 minuti in resorcina - fucsina secondo *Weigert*.

Differenziazione in alcool a 96 % e lavatura in acqua distillata.

Colorazione dei nuclei nella soluzione suddetta di rosso fisso per 5 e rispettivamente 10 - 15 minuti, acqua, serie degli alcool, xilolo, balsamo.

Già *Becher* ha raccomandato come colorante turchino dei nuclei la naftazarina. Noi abbiamo trovato una variante con forza di colore spiccata, molto adatta per la tecnica istologica, colla quale già in tempo relativamente breve si riesce ad ottenere buone colorazioni turchine dei nuclei, per quanto non così rapidamente come col rosso fisso per nuclei.

Istruzione per la colorazione alla naftazarina (v. fig. 6): Norme per preparare la soluzione di naftazarina: gr. 0,10 di naftazarina e 5 gr. di cloruro di alluminio puro vengono fatti bollire per 5-10 minuti in 100 cc. di acqua distillata. Dopo raffreddamento la soluzione viene filtrata, dopo 8 giorni un'altra volta. Aggiungere un po' di timolo.

Istruzioni per la colorazione naftazarina-eosina: Fissazione in sublimato, in alcool o formolo. Colorare le sezioni congelate per 10-15 minuti, quelle in paraffina per 1-24 ore, (una sovracolorazione non si produce facilmente), indi lavare in acqua distillata. Colorazione successiva con eosina.

Tutte le colorazioni turchine dei nuclei, si tratti di naftazarina o di ematossilina, è bene colorarle successivamente con una sostanza colorante che colori intensamente in rosso, tanto il protoplasma quanto il sangue. Ma la maggior parte dei colori di eosina sono molto sensibili alla luce, e questa proprietà riesce assai svantaggiosa in preparati che a scopo didattico devono essere conservati a lungo. Se si devono proiettare le sezioni con colorazione di contrasto a base di eosina, esse perdono rapidamente il colore. Era quindi sentito il bisogno di trovare, per la colorazione di contrasto del plasma, dei coloranti intensamente rossi che fossero resistenti alla luce. Noi abbiamo in primo luogo sperimentato tutte le marche di eosina esistenti in commercio e constatato che la eosina solubile in alcool (*Spritleösliche Eosin*, standardizzato «*Bayer-Meister Lucius*») è quella che resiste meglio alla luce. Per una colorazione rossa resistente alla luce si può però usare anche il su ricordato rosso fisso per nuclei in soluzione a 0,10‰, che viene acidificata con una goccia di acido acetico. Inoltre si presta bene anche, come colorante che colora intensamente in rosso ed è resistente alla luce, l'azophloxin (*Anders*). Noi usiamo l'azophloxin in so-

luzione acquosa a 0,05 ‰, che prima dell'uso viene debolmente acidificata con acido acetico, come colorazione successiva per la naftazarina, l'ematossilina e la ferro-ematossilina.

Desideriamo di richiamare in particolare l'attenzione su una colorazione combinata da noi provata in questi ultimi tempi, che è assai semplice e dà risultati migliori della colorazione ematossilina-eosina, non soltanto riguardo alla resistenza alla luce, ma anche alla bellezza del colore. Inoltre la colorazione combinata possiede il grande vantaggio che la colorazione turchina dei nuclei si compie contemporaneamente colla colorazione rossa di contrasto del protoplasma, del sangue ecc. Si ottiene dunque un buon equilibrio tra intensità della colorazione dei nuclei e della colorazione rossa di contrasto e si esclude così ogni errore inerente alla differenziazione. Colla nostra nuova colorazione combinata di naftazarina-azofloxin non è anche in genere necessaria una differenziazione. Con una durata di colorazione uguale, che si può stabilire secondo i propri gusti, si ottengono sempre gli stessi risultati.

Si tengono pronte 2 soluzioni:

I. Soluzione di naftazarina

Naphtazarina gr. 0,25

Cloruro d'alluminio chimicamente puro » 5

Sciogliere in 100 cc. di acqua distillata, far bollire per 5-10 minuti, filtrare dopo raffreddamento.

II. Soluzione acquosa a 0,10 ‰ di azophloxin

Prima dell'uso si mescolano

3 parti della soluzione I

1 parte » » II

e si filtra. È meglio di preparare la miscela sempre fresca, ma si può anche usarla per parecchie volte.

Le sezioni congelate vengono colorate per 10-15 minuti nella miscela colorante I e II, le sezioni paraffinate per circa 20-30 minuti. Dopo la colorazione, lavatura in acqua distillata, disidratazione in alcool, inclusione in caedax.

Questa semplice colorazione dovrebbe bastare nella maggior parte dei casi per le diagnosi usuali. La colorazione dei nuclei

e quella del protoplasma sono ben distinte, il sangue è di un rosso carico brillante.

La prova della resistenza alla luce dei coloranti usati viene fatta per i nostri scopi, esponendo i preparati istologici colorati per 8 giorni a una irradiazione intensiva colla lampada Vitalux.

Tra le colorazioni per il connettivo la più nota è quella di *van Gieson*. Dopo una previa colorazione nucleare con ematossilina e rispettivamente ferroematossilina si colora successivamente con una soluzione acido picrico - fucsina acida. Nelle sezioni così colorate il tessuto connettivo è dapprima colorato intensamente in rosso, tuttavia il preparato è poco resistente alla irradiazione.

In luogo della picrofucsina si usa quindi vantaggiosamente una colorazione successiva col rosso fisso per nuclei resistenti e alla luce (v. fig. 7).

Metodo di colorazione: Colorazione dei nuclei con ferro-ematossilina per 2-10 minuti, lavatura a fondo con acqua di conduttura. Colorazione successiva per 5-10 minuti colla soluzione seguente:

Soluzione acquosa satura di acido picrico 10 cc.

Soluzione acquosa satura a caldo di rosso fisso per nuclei 0,75 »

Lavare in acqua distillata, 2 volte alcool a 96%, alcool ass., xilolo, balsamo.

Colorazioni ancora più belle, del pari resistenti alla luce si ottengono usando il thiazinrot (rosso tiazina) (stand. "*Bayer-Meister Lucius*,,) (v. fig. 8).

Metodo di colorazione: Colorazione dei nuclei con ferro ematossilina per 2-10 minuti, lavatura a fondo in acqua di conduttura, colorazione successiva per 5-10 minuti nella soluzione seguente:

Soluz. acquosa satura di acido picrico 10 cc.

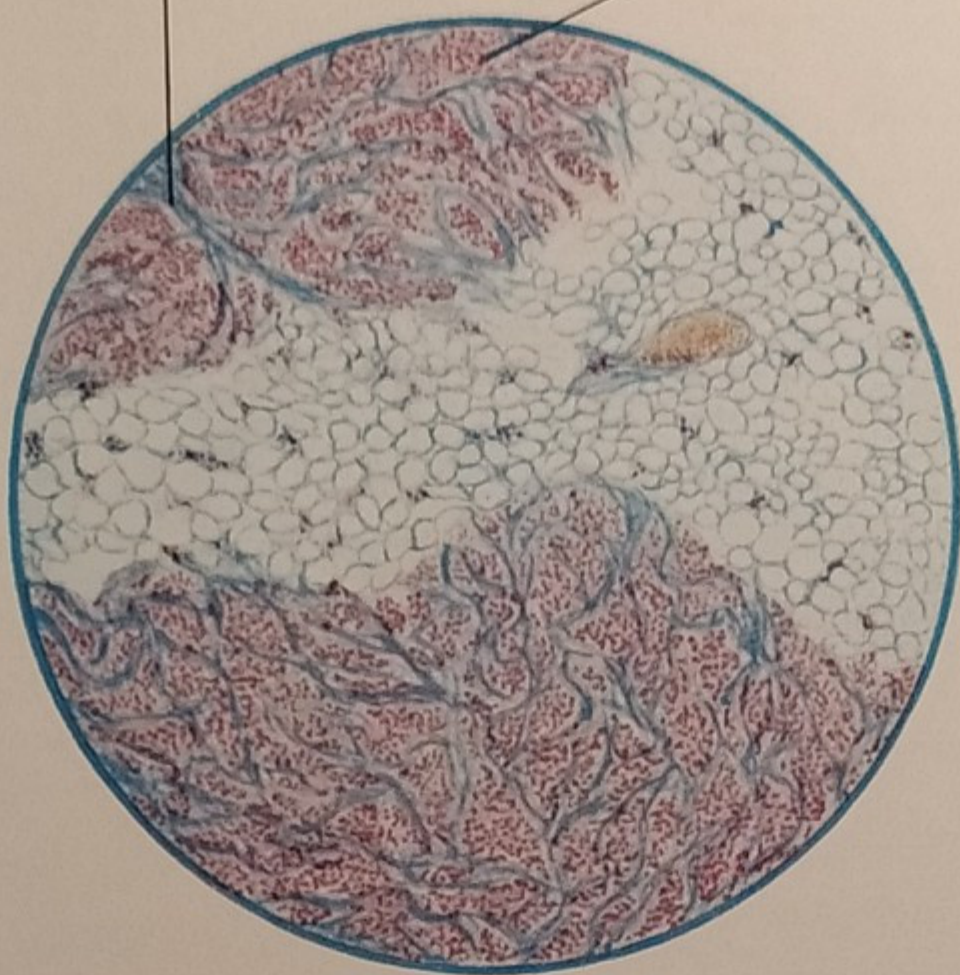
Soluzione acquosa a 1% di thiazinrot 0,75 »

Lavare in acqua dist., 2 volte in alcool a 0,96%, alcool ass., xilolo, balsamo.

Per includere tutti i nostri preparati istologici colorati, noi non usiamo più già da lungo tempo il balsamo del Canada, che contiene sempre acido e si acidifica ancora ulteriormente, ma una sostanza denominata "caedax" ottenuta per via sintetica, del tutto neutra, trasparente, dall'indice di refrazione di 1,55. Il caedax è

Tessuto connettivo

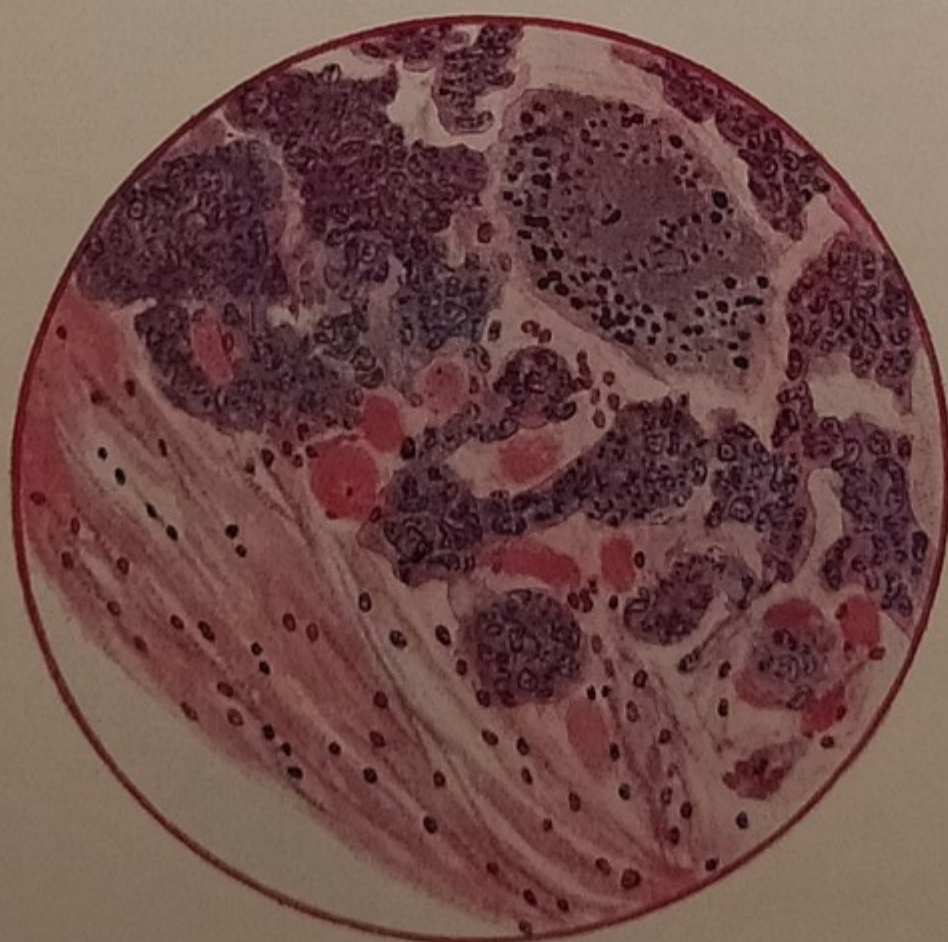
Nidi di Ca.



5

Carcinoma della mammella

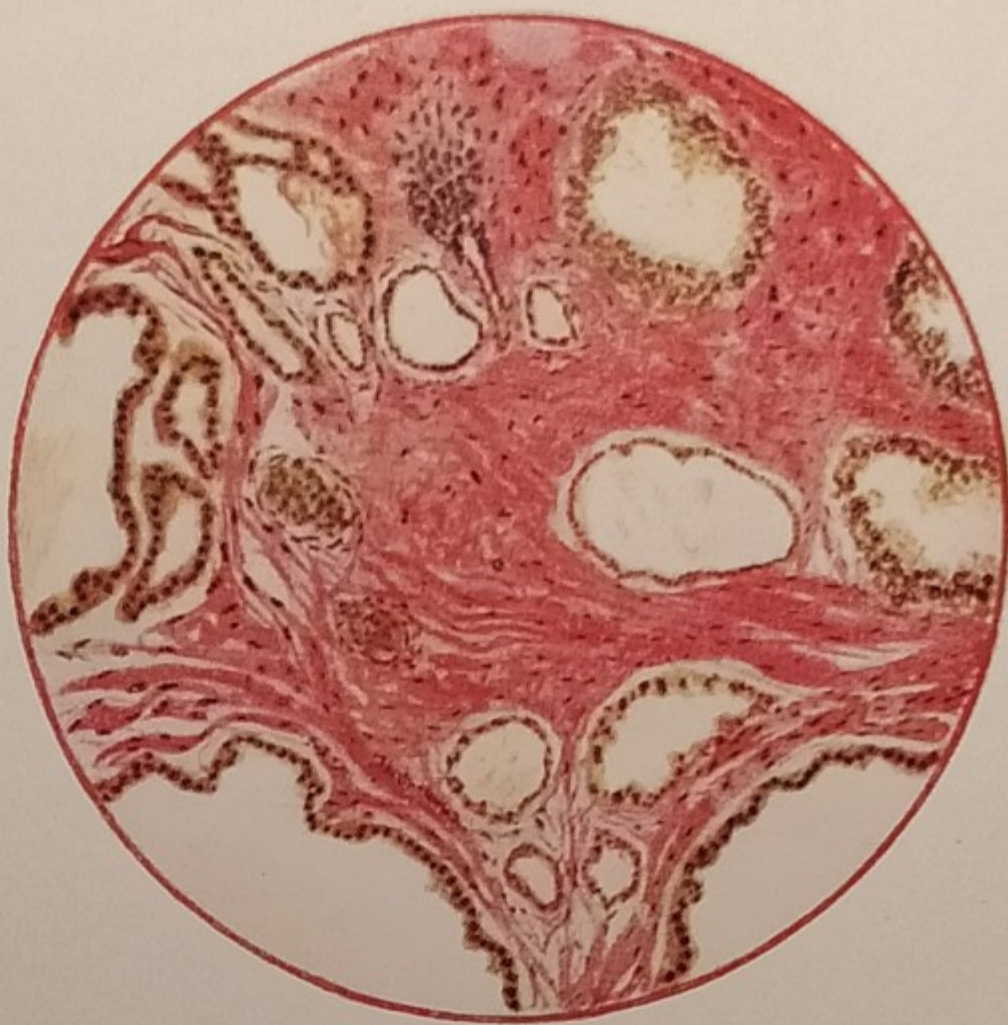
*Colorazione del tessuto connettivo col metodo di Mallory
e rosso fisso per nuclei come colorante dei nuclei*



6

Carcinoma del topo

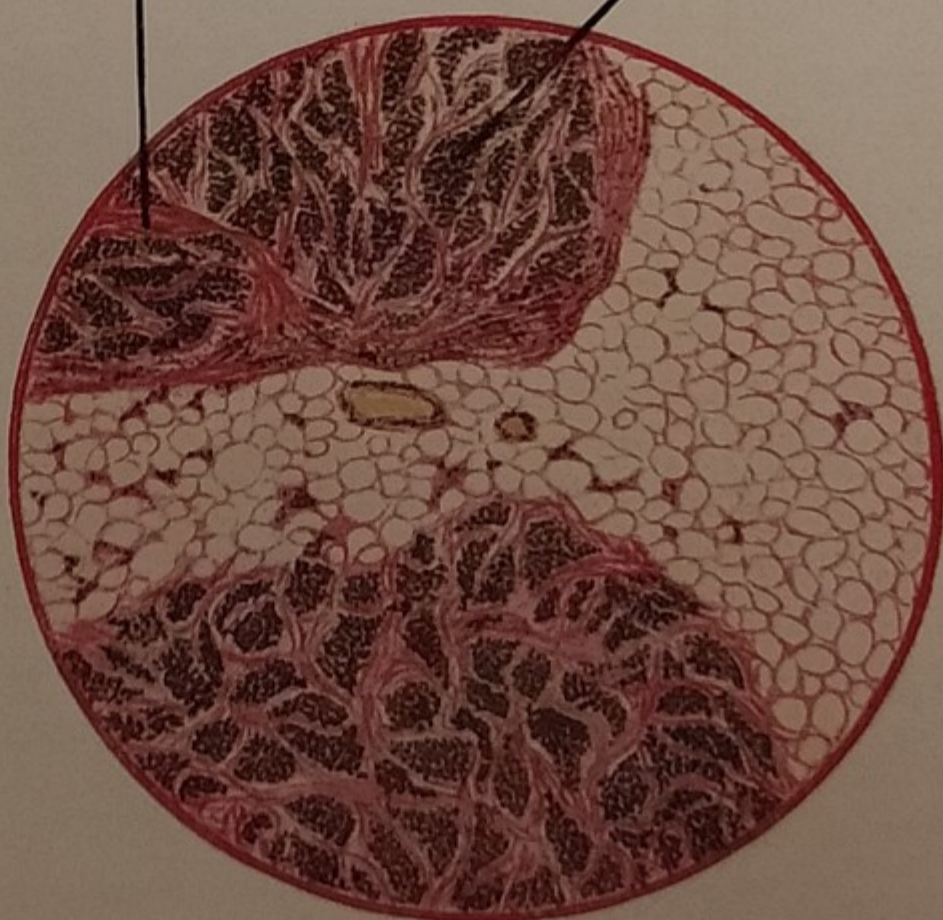
Naftazarina-Eosina (LF 106)



7 Fibroadenoma della mammella (fissazione in formolo)
Ferro-ematossilina-Rosso fisso per nuclei

Tessuto connettivo

Nidi di Ca.



8 Carcinoma della mammella
*Colorazione del tessuto connettivo. Colorazione preliminare
 con ferro-ematossilina, successiva con Rosso tiazina*

raccomandabile senza restrizioni per tutte le sostanze coloranti delicate, ad es. per la differenziazione degli elementi formati del sangue colla colorazione di *May-Grünwald* o di *Giemsa*, quando si usi la tionina o il violetto di cresile per far risaltare cellule nervose secondo *Nissl* ecc. Il caedax si indurisce all'aria come il balsamo del Canada, può essere diluito con xilolo o toluolo, quando a temperatura fresca sia diventato troppo attaccaticcio.

Quanto sia importante di usare dei materiali buoni, sempre uniformi, e una buona metodica di colorazione per giudicare i processi patologici alla luce del preparato istologico, abbiamo potuto constatare sperimentando tutte le sostanze coloranti dei grassi che sono in commercio. Per far risaltare il grasso nelle cellule e nei tessuti si usa abitualmente una soluzione di sudan o di scarlatto.

Ma queste sostanze coloranti vengono preparate in omaggio ai bisogni della tecnica senza tener conto del loro uso per esami istologici. Tra i coloranti provati ne trovammo molti assolutamente inadatti ai nostri scopi, coi quali non si riuscì affatto a dimostrare il grasso, specialmente in piccoli focolai, quali si trovano ad es. nell'arteriosclerosi iniziale. Delle importanti alterazioni patologiche possono pertanto rimanere del tutto nascoste, quando non si abbiano a disposizione i materiali appropriati.

Abbiamo trovato che una sostanza colorante che colora ottimamente il grasso nei tessuti è il Sudanrot (rosso sudan) (stand. *Bayer-Meister Lucius*). Con essa si riesce a mettere in luce tutti i più piccoli focolai di degenerazione grassa, che appaiono di colore rosso-giallo lucente, specialmente se si seguono le istruzioni dettate da *W. Gross* per la colorazione del grasso. Questo metodo ha il grande vantaggio che la sostanza colorante non viene sciolta in un liquido che discioglie contemporaneamente i grassi, come l'alcool e l'acetone, bensì in diacetina che scioglie assai bene la sostanza solvente, ma non il grasso. Con ciò è eliminato il pericolo che, come succedeva finora, usando soluzione alcoolica di sudan, il grasso scompariva dalla sezione.

Istruzione: Le sezioni vengono colorate a 60° per 20 minuti nella seguente soluzione: gr. 0,60 di rosso sudan vengono sciolti a 60° in 100 cc. di diacetina e acqua distillata in parti uguali. La soluzione viene filtrata prima dell'uso. Dopo la colorazione le sezioni vengono lavate in acqua distillata. Colorazione dei nuclei con naftazarina o ematossilina. Sciacquare in acqua di conduttura, includere in gelatina-glicerina.

Osservando queste norme di colorazione e usando gli stessi materiali si otterranno sempre risultati ugualmente buoni e ben paragonabili. Le colorazioni ricordate dovrebbero essere quelle più spesso usate per la pratica istologica giornaliera. Per tutti gli altri metodi importanti e sperimentati, alle confezioni in commercio sono unite le istruzioni per le sostanze coloranti standardizzate « *Bayer-Meister Lucius* ».

A mio avviso la introduzione delle nuove sostanze coloranti standardizzate contribuirà indubbiamente a facilitare gli studi istologici. Il giudizio dei risultati di colorazione sarà semplificato e si avrà la possibilità di paragonare esattamente i risultati di colorazione ottenuti in varie epoche e in vari luoghi. Inoltre anche in istologia si darà sempre più peso all'uso di sostanze coloranti buone, resistenti alla luce e ai fattori riduttori e si cercherà di usufruire anche dei nuovi coloranti perfezionati che la tecnica usa.

I metodi attuali di lotta contro la difterite

PROF. DOTT. H. SCHMIDT

Dal reparto Siero-batteriologico » *Bayer-Meister Lucius-Behringwerke* «
e dall' Istituto di Terapia sperimentale "Emil v. Behring", Marburg.

La terapia e la profilassi della difterite è sempre un problema aperto. Abbiamo bensì, come si dirà in seguito, un siero migliore e più efficace che in passato e disponiamo di una serie di preparati per la profilassi della difterite, la cui efficacia sembra essere sicura, ma le basi scientifiche della immunità nella difterite sono attualmente, dopo un periodo di apparente chiarificazione, di nuovo incerte poichè si è imparato che in tutti i singoli campi le condizioni sono assai più complicate di quanto si fosse finora ammesso.

A parte il fatto, che non sappiamo ancora quale sia effettivamente la natura propria della tossina e dell'antitossina, non sappiamo neppure con sufficiente sicurezza come la tossina agisce, dove è il suo punto di attacco nell'organismo, quanta tossina e con quale rapidità si produce in una affezione difterica, in cosa consiste l'azione detossicante dell'antitossina, da cosa dipende la immunità verso la difterite, come si può misurarla ecc.

La nozione dunque della impossibilità in cui siamo di rispondere esattamente ai problemi fondamentali deve renderci modesti, pure riconoscendo d'altra parte i progressi fatti nella lotta contro la difterite, ad onta delle manchevolezze delle nostre cognizioni.

Vediamo brevemente in cosa consistano questi progressi. In primo luogo la sieroterapia e la siero-profilassi sono sempre al primo posto nella lotta contro la difterite.

I nostri sieri curativi sono divenuti di più elevata efficacia. Attualmente si può, mediante la cernita di cavalli datori appropriati e mediante metodi di immunizzazione strettamente indivi-

duali, ottenere rendimenti in antitossina assai elevati, tanto da poter giungere nel siero nativo a titoli di 2000 U. A. per cc. e più. La spiccata prevalenza delle globuline vettrici dell'antitossina rispetto all'albumina, nel siero di cavalli così altamente immunizzati fa comprendere che un titolo di circa 2500 U. A. per cc. dovrebbe essere il massimo che un cavallo può dare. Anche dai bovini e dal montone si riesce attualmente ad ottenere sieri di più alto titolo di quelli finora in commercio dal titolo di solo 100 U. I.; ad es. un siero di montone con 400 U. A. e uno di bue con 500 pro cc. Tuttavia i fissipedi sono di gran lunga inferiori al cavallo come formatori di antitossina.

Il siero nativo ha notoriamente la spiacevole proprietà di perdere nello spazio di pochi mesi la sua limpidezza originaria. Dapprima si fa torbido, poi forma fiocchi e precipitati. In pari tempo il titolo iniziale si abbassa. Dopo molti studi preliminari, che in parte risalgono a parecchi anni addietro, si può oggi offrire ai medici un siero nativo normale, che si mantiene limpido e con la stessa efficacia per un periodo di cinque anni.

Ancor meglio rispondono ai requisiti della pratica i sieri depurati. Il principio della depurazione si basa, come è noto, sulla nozione che la pseudoglobulina è il vettore proprio della azione antitossica del siero; la depurazione consiste pertanto nella eliminazione degli albuminoidi, che come l'albumina, non agiscono terapeuticamente come antitossina. In questo senso possiamo attualmente offrire i nostri sieri in forma migliore che per il passato. Secondo il rapporto tra globulina e albumina nel siero nativo si possono ottenere mediante la depurazione, dei sieri poveri di albumina, il cui tasso di albumina non oltrepassa il 5%, oppure si possono preparare sieri concentrati con un tasso di albumina di al massimo il 12%. Intendendo come povero di albumina un siero con tasso sotto al 5%, un siero con 1000 U. A. per cc. costituisce il limite massimo di efficacia che si può ottenere per un siero povero di albumina. La diminuzione della frazione albumina che procede di pari passo coll'aumento dell'ef-

ficacia comporta, che una depurazione mediante eliminazione dell'albumina non permette più una essenziale diminuzione del tasso albuminoide; ma d'altra parte anche la possibilità di concentrazione ha dei limiti, perchè il tasso di albumina permesso in Germania non deve oltrepassare il 12^o‰. Così avviene che in generale 2000 U. A. pro cc. rappresentano il limite pratico della concentrazione. Tuttavia, con un rapporto particolarmente favorevole tra globulina e albumina si possono ottenere sieri nativi relativamente poveri di albumina di più elevate concentrazioni, con un tasso di albumina al di sotto del 12^o‰.

Queste sono per altro eccezioni. Diversamente vanno le cose quando, come avviene fuori di Germania, la quantità massima di albumina permessa è più alta, ad es. del 18-20^o‰. Allora è naturalmente possibile di preparare sieri più concentrati, di 4000 U. A. e più pro cc. Ad es. le Behringwerke hanno potuto preparare un siero antidifterico da 5000 U. A. pro cc. con solo il 15,5^o‰ di albumina.

Usando questi sieri altamente concentrati, limpidi come acqua e stabili, si può attualmente introdurre molta antitossina in un volume relativamente piccolo.

Ed ora: Colla somministrazione di sieri di così elevata concentrazione i risultati clinici sono anche divenuti corrispondentemente migliori? A questa domanda si può rispondere affermativamente ma con restrizioni, in quanto che hanno importanza decisiva il momento e il modo della iniezione.

Se in un dato caso appare indicato di introdurre nel paziente molta antitossina quanto più rapidamente è possibile, onde giunga con la massima rapidità possibile alla tossina fissata nelle cellule, allora è opportuno di introdurre intravene sieri di alta concentrazione. Il grande vantaggio sta nel volume minore e nell'immediato assorbimento del siero. Si potrebbe ad es. con 20 cc. di un siero di 2000 U. A. portare di colpo nel circolo 40000 U. A. mentre per ottenere lo stesso scopo ci vorrebbero 40 cc. di un siero con 1000 U. A. e 80 cc. con un siero di 500 U. A.

Siccome il tasso abituale - e finora prescritto in Germania - in fenolo dei sieri in qualche raro caso è mal tollerato dai pazienti, si sta studiando per sostituire il fenolo con sostanze meno tossiche e tuttavia di uguale valore per la conservazione dei sieri.

Ciò ha soprattutto importanza per i sieri di elevata efficacia che si vogliono iniettare intravene e che anche oggi si potrebbero preparare senza fenolo.

D'altra parte è opportuno quando si usi la via intramuscolare (le iniezioni sottocutanee non dovrebbero essere praticate data la lentezza dell'assorbimento) di usare un siero povero di albumina. Comunque il siero concentrato di 2000 U. A. o eventualmente un siero di efficacia anche maggiore con oltre il 12 % di tasso di albumina sono meno adatti per iniezioni intramuscolari, perchè da ricerche estese (*A. Demnitz e W. Scholz*), che sono ancora in via di prosecuzione, è risultato che l'assorbimento di vari sieri iniettati intramuscoli con uguale valore ma con differente tasso di albumina, si compie tanto più rapidamente, quanto più basso è il tasso di albumina. Queste ricerche confermano e completano ricerche simili, che furono fatte da *Hetsch e Bieling, Walbum, Szirmai* e altri.

La questione delle dosi è stata ripresa in attenta considerazione dopo che taluni insuccessi constatati in questi ultimi anni in casi maligni, anche con dosi elevate di antitossina, hanno fatto dubitare del valore in genere della sieroterapia. Ma tutti i clinici sperimentati non hanno alcun dubbio sul valore pratico della sieroterapia, sanzionata da 35 anni di esperienza; gli è invece che le nozioni acquisite in questi ultimi decenni, soprattutto quelle in via sperimentale sulla tossina e l'antitossina difterica, hanno contribuito a considerare troppo unilateralmente la terapia e la immunità della difterite come puramente antitossiche. Finchè la difterite ebbe quel carattere benigno, che presentava quando fu iniziata l'era sieroterapica (1894), sembrò di poterle spiegare tutto in senso tossico - antitossico. Ma la ripresa di epidemie di difterite maligna insegnò a rivedere le nostre

concezioni sull'essenza della infezione difterica e sulla immunità verso la difterite.

L'uomo ammalato di difterite ha bisogno del soccorso medico non per la sua infezione da bacilli della difterite, bensì per il suo stato di malattia. Ma questo non è secondo l'opinione di *Jürgens* e altri, la conseguenza diretta, bensì la conseguenza indiretta della infezione, in quanto che la malattia rappresenta già la reazione alla tossina difterica dell'organismo che sta immunizzandosi. La immunità è dunque già in gestazione quando si insedia e non è presente soltanto quando la malattia è finita. Nella infezione e nell'avvelenamento sperimentale delle cavie, le condizioni sono diverse che nell'uomo. Molti bambini hanno una immunità naturale verso la difterite, molti altri la acquistano nel corso di una malattia, il che era possibile anche nell'era preserica.

Questa immunità è esclusivamente antitossica? Sembra difficile ammetterlo, perchè delle ricerche su convalescenti fatte nelle cliniche di *Jürgens* e v. *Pflaundler* hanno dimostrato che il titolo in antitossina del siero di sangue spesso corrispondeva soltanto a $1/100$ - $1/50$ di U. I., ossia era assai più basso di quello che noi riteniamo sufficiente nei bambini sani per prevenire un'infezione.

La prova di *Schick*, della quale dovremo parlare ancora più avanti, non è misura assolutamente sicura della immunità. Anche dei bambini Schick - negativi possono talvolta ammalare. Quanto noi misuriamo colla prova di Schick è una sensibilità alla tossina, che non può essere senz'altro identificata colla ricettività alla difterite.

Dobbiamo quindi ammettere accanto alla immunità antitossica, che possiamo provocare artificialmente in modo passivo e attivo, anche una immunità naturale che per altro non possiamo afferrare nell'esperimento e che non possiamo misurare nell'uomo, ma che è fondamentale di importanza determinante per la produzione di una malattia dopo una infezione difterica, nonchè per la guarigione della stessa.

Se si infetta con bacilli della difterite un organismo non immune, segue - secondo l'opinione di *Jürgens* e di altri - dapprima uno stadio di disordini generali, nel quale l'organismo in via di ammalarsi si trasforma.

Nel corso di questa trasformazione i bacilli difterici che erano penetrati nell'organismo vanno distrutti e possono ancora trovare soltanto nella mucosa naso-faringea, luogo dell'infezione primaria, condizioni di sviluppo favorevoli, dopo che la mucosa faringea, in conseguenza della trasformazione immuno-biologica, ammalata in certo modo dall'interno verso l'esterno e permette la produzione del quadro della difterite faringea (*Jürgens*). (Un portatore sano di bacilli non presenta reazione mucosa).

La sieroterapia raggiunge pertanto i risultati migliori quando il siero viene somministrato al momento della reazione generale prima che si sia sviluppata una difterite faringea. In tal caso il siero dà una immunità accelerata e un miglioramento immediato delle condizioni generali. Se una difterite faringea si è già prodotta, le alterazioni patologiche già prodottesi seguono il loro decorso, ma il processo non si propaga.

Tuttavia in questo stadio sono già necessarie dosi maggiori di antitossina. Senza sieroterapia o con sieroterapia insufficiente il processo si propaga oltre, e secondo il grado delle facoltà difensive dell'organismo, del quale la formazione di antitossina è una parte essenziale, il processo morboso della mucosa è arrestato prima che la produzione della tossina abbia paralizzato le forze difensive.

Prima della introduzione della sieroterapia era dunque la formazione di antitossina propria dell'organismo che dava la guarigione, e la conseguenza era una immunità. Oggi, che si ottiene sempre col siero una immunità passiva antitossica, la produzione di antitossina propria dell'organismo resta in secondo piano e la conseguenza ne è che, dopo eliminazione dell'antitossina estranea artificialmente introdotta, non rimane una immunità sufficiente, sicchè si osserva spesso una nuova infezione

difterica. La sieroterapia pregressa spiega pertanto a mio avviso il perchè dei bassi valori di antitossina nel sangue di convalescenti di difterite, constatati, come sopra si disse, da *Jürgens* e v. *Pflaundler*.

Orbene ci sono sempre stati casi di così detta difterite maligna, nei quali la sieroterapia parve essere inefficace. Essi erano noti anche a *Behring* e non si deve dimenticare che *Behring* considerava il suo siero antidifterico antitossico soprattutto un profilattico.

Se si va alla ricerca delle cause per le quali di quando in quando la difterite si presenta in forma maligna, nella quale un disordine del circolo a rapida produzione e per lo più irreparabile domina il quadro clinico, si può, in base agli studi di *Hottinger* e altri vedere questa causa soltanto per esclusione nella specie particolare dei bacilli difterici, senza che si possa dire al riguardo qualche cosa di più preciso. E' sperabile che le nuove importanti ricerche di *J. Hirsch* sul chimismo della moltiplicazione e della produzione di tossina dei bacilli difterici contribuiscano a far distinguere i bacilli maligni della difterite dagli altri.

In base alle osservazioni e alle constatazioni sperimentali finora fatte si può ammettere che la tossina formata da bacilli maligni della difterite non si distingue dalla tossina di altri bacilli della difterite, ma che i bacilli maligni hanno una virulenza del tutto insolita, che per altro perdono rapidamente con la cultura in terreni abituali. Questa virulenza trova espressione nel fatto che essi formano rapidamente una tossina dotata di grande avidità per le cellule; questa tossina viene quindi legata assai rapidamente, il che si accorda col fatto che anche, con i metodi più fini, di regola nei bambini colpiti da difterite non si riesce a dimostrare tossina libera nel sangue, o tutto al più se ne dimostrano tracce.

Riguardo alle cellule alle quali la tossina soprattutto si lega, si deve pensare al tessuto linfatico e ai linfociti liberi, la cui

funzione più importante è, secondo l'opinione di *v. Albertini*, la legatura delle tossine alle cellule. Si accorda con questo concetto l'osservazione di *F. Meyer* che sotto l'influenza dell'infezione batterica il numero dei linfociti diminuisce relativamente ed anche assolutamente e che un cambiamento verso un miglioramento clinico ottenuto con la somministrazione di antitosina si rispecchia nell'aumento dei linfociti (*Köbner*).

Ma con ciò ancora non si spiega il grave perturbamento del circolo nella difterite maligna. In base al grado clinico si potrebbe ritenerlo dovuto ad un disordine endocrino della funzione nervosa autonoma. Per questo concetto parla l'osservazione già da lungo tempo fatta da patologi e recentemente di nuovo constatata sperimentalmente e clinicamente da *F. Meyer*, che la ipofisi presenta nella difterite maligna alterazioni più o meno spiccate, che possono essere interpretate come effetti tossici, tenendo al riguardo presente anche la vicinanza dell'ipofisi alla mucosa faringea. Inoltre si possono constatare alterazioni alla tiroide, e la partecipazione dei surreni è nota da lungo tempo nella difterite sperimentale della cavia. Si pensi anche al tasso glicemico più alto nella difterite maligna (*Hottinger, Elkeles e Heimann*).

Tuttavia non è con ciò dimostrato che nella difterite maligna la tossina rapidamente formata e avidissima delle cellule causi il grave disordine circolatorio da perturbamento della funzione di glandole endocrine per il tramite del sistema nervoso autonomo. Certo che anche dosi minime di tossina Di., agiscono direttamente sul cuore stesso (il che è stato dimostrato con lo elettrocardiogramma da *Siegel* e da altri), e *U. Friedemann* considera giustificato di ritenere che la tossina Di. agisca sulla parete vasale stessa o sul sistema nervoso vasale periferico che la innerva. Ad altri studi clinici e patologici spetta di stabilire se l'azione della tossina sul sistema nervoso vasale sia di natura diretta o indiretta (eventualmente da causa ormonica). Comunque è ben comprensibile di quale essenziale importanza sia il

momento nel quale si applica la sieroterapia, momento che non sarà mai abbastanza precoce, tenendo anche presente che con la iniezione precocissima è presumibile non siano necessarie dosi assai alte di antitossina. Inoltre si capisce che se la tossina difterica ha ormai causato il disordine del circolo, anche grandi quantità di antitossina non siano talvolta in grado di provocare un cambiamento verso il meglio.

La tossina ulteriormente formata sarà bensì neutralizzata, ma il processo morboso locale può ad onta di ciò procedere oltre, perchè per inibirlo è necessario uno stato di immunità, il quale richiede oltre all'antitossina necessaria un sistema nervoso autonomo intatto e funzioni endocrine normali.

Logicamente si dovrebbe tentare nella difterite maligna di coadiuvare la sieroterapia antitossica assolutamente necessaria con rimedi che siano in grado di correggere la paralisi periferica del circolo da causa tossica. Benchè i preparati ormonici finora usati a questo scopo non abbiano dato finora risultati tangibili, pur tuttavia questa via merita verosimilmente di essere ulteriormente seguita. Non è impossibile che i risultati favorevoli che *Benedict* vide dalle trasfusioni di sangue nelle difteriti maligne dipendano da ciò, che col sangue vengono introdotte anche le sostanze ormoniche necessarie per correggere il disordine endocrino. Infine ci sono delle osservazioni di *Hottinger*, secondo le quali anche un siero privo di antitossina agirebbe favorevolmente nella difterite, anche se di tipo maligno. Tuttavia in questi casi di media gravezza trattati con siero a vuoto si ebbero in convalescenza offese miocardiche con una frequenza 3-4 volte maggiore che nei malati trattati con antitossina, tanto che le constatazioni di *Hottinger* sul valore terapeutico del siero a vuoto hanno bisogno di conferma da parte di altri autori. In ogni modo esperienze ulteriori dovrebbero tener conto della possibilità di una influenza ormonica sull'organismo da parte del siero a vuoto. Ma in ogni caso si deve provvedere con dosi sufficienti di antitossina in modo che la tossina ulteriormente formata e se possibile non ancora troppo saldamente legata venga

neutralizzata in quanto che è indubbio il fatto basato su innumeri esperimenti ed esperienze, che la tossina è neutralizzata dall'antitossina e non dal siero a vuoto. Per altro il siero a vuoto non si mostra del tutto inefficace verso quantità minime di tossina, le quali sono di gran lunga al di sotto di una dose letale per la cavia, ma non si può al riguardo escludere la possibilità di uno stimolo aspecifico alla formazione dell'antitossina, e inoltre si deve ricordare che il sistema linfatico può mediante legatura tenere lontana una certa quantità di tossina con offesa propria delle cellule di importanza vitale.

Si è ammesso che nella difterite maligna si tratti di un'infezione mista con streptococchi; tuttavia non in tutti i casi furono dimostrabili degli streptococchi e anche il quadro clinico della difterite maligna non appoggia il concetto di una compartecipazione streptococcica (*Hottinger*).

Riguardo alle dosi del siero antitossico, in generale ce ne vorrà tanto meno quanto più precocemente lo si inietta, e quando sia iniettato molto precocemente non c'è ragione per scostarsi dalla dose minima indicata da *Schick* di 500 U. A. pro Kg. di peso corporeo.

Recentemente *Friedemann* ed altri hanno raccomandato di non usare il siero a dose singola alta, ma di iniettarlo ripetutamente, al quale riguardo si potrà forse avere una norma per stabilire gli intervalli tra una iniezione e l'altra in base al numero dei linfociti, nel senso di *F. Meyer*. Specialmente quando si sospetta una difterite maligna si dovrebbe iniettare il siero quanto più presto possibile, e nel modo più rapidamente assorbibile, ossia per via intravenosa. Tutto sta che la tossina venga neutralizzata prima che possa danneggiare cellule d'importanza vitale. In tal senso ogni sieroterapia dovrebbe essere profilattica.

Molto istruttive da questo punto di vista sono state le esperienze sugli animali, le quali hanno dimostrato che quanto maggior tempo passa tra intossicazione e somministrazione di siero, tanto più difficile è la guarigione; che è necessaria una maggiore quantità di antitossina, finchè da ultimo anche le dosi altissime non possono

più dare la guarigione. Riferiamo a titolo di esempio le ricerche di *von Schöne*, che iniettò nelle cavie 1,5 D. l. m. di tossina e più tardi siero per via intracardiaca.

Bastarono 0,01 U. A., dopo 15 minuti, 0,30 U. A. dopo un'ora, 50 U. A. dopo 2 ore, 1000 U. A. dopo 2 ore e $\frac{1}{4}$, nel qual caso 500 U. A. non bastarono più. Dopo 2 ore $\frac{1}{2}$ anche 2000 U. A. rimasero senza effetto.

Si vede dunque come anche un breve periodo di tempo può avere influenza decisiva. Orbene in pratica sarà assai difficile nelle epidemie di difterite maligna di agire sulla infezione al momento giusto, perchè le manifestazioni cliniche al faringe sono già una conseguenza della reazione immunitaria prodottasi, e in casi rari lo svolgimento tossico della reazione generale può essere già così grave nelle prime 12-24 ore, che anche l'intervento dell'arte entro le prime 24 ore può giungere troppo tardi. Per altro le osservazioni di *Bie*, *Friedemann*, *Szirmai* e altri hanno dimostrato che le dosi altissime possono talvolta avere ancora ragione di tali casi.

Una spiacevole manifestazione concomitante di ogni sieroterapia è la possibilità della malattia da siero, che per se stessa non è pericolosa e suole regredire senza danno, ma è per il paziente così penosa, che nulla dovrebbe essere tralasciato per evitarla. Non è qui il luogo di elencare tutti i mezzi che si hanno per emendare i sintomi di una malattia da siero già sviluppatasi.

Molto più importante sarebbe o di cambiare il siero immune relativo o di modificare con congrui provvedimenti l'organismo in modo, che la reazione biologica che si compie tra albumina del siero e gli anticorpi formati contro l'albumina nel periodo tra iniezione di siero e scoppio della malattia da siero, o non si produca o non possa agire nelle cellule interessate. Gli studi relativi lasciano adito a qualche modesta speranza; se si riuscisse nello scopo, si toglierebbe un grave ostacolo alla sieroterapia e soprattutto la sieroprofilassi diverrebbe regina incontrastata.

Per la profilassi della difterite il siero è l'unico mezzo che noi possediamo per proteggere subito dei soggetti minacciati direttamente dalla infezione. Purtroppo la immunità passiva così ottenuta non dura a lungo, e non può essere portata a più di circa 3 mesi anche aumentando la dose del siero e ripetendo la iniezione. Comunque una sieroprofilassi applicata sistematicamente può diminuire notevolmente la mobilità della difterite (*Braun*).

Due svantaggi ha tuttora la sieroprofilassi; in primo luogo la già citata malattia da siero, che per altro ha un'importanza secondaria, e per le basse dosi di siero che sono necessarie e perchè si tratta per lo più di bambini, che sono colpiti dalla malattia da siero relativamente più di rado degli adulti; in secondo luogo, la possibilità che la iniezione di siero di cavallo renda il soggetto ipersensibile verso un'ulteriore iniezione fatta per difterite e per qualche altra malattia, il che è tanto più da tenersi in conto, in quanto che quasi tutti i sieri curativi sono ottenuti dal ca-

vallo. Per quanto questo secondo svantaggio non abbia in pratica quella importanza che sembrerebbe dovesse avere teoricamente, pur tuttavia merita attenta considerazione. Per questa ragione è raccomandabile di usare a scopo profilattico un siero antidifterico ottenuto dal montone o dal bue. Tali sieri sono attualmente in commercio con 400 e 500 U. A. pro cc., sicchè la dose da iniettare a scopo profilattico è assai bassa e non provoca quindi abitualmente la malattia da siero.

Altre possibilità, ad es. di togliere con procedimenti chimici all'albumina del cavallo il carattere della specie, sicchè non possa più sensibilizzare verso il siero di cavallo, sono purtroppo assai lontane. E anche in tal modo non si toccherebbe il problema di evitare la malattia da siero, ma esisterebbe soltanto la possibilità di escludere un eventuale shock serico primario. La cosa più semplice sarebbe di separare ancor meglio l'antitossina dalla sieroglobulina del cavallo, ma a ciò non si è ancora riusciti in modo soddisfacente.

Data la transitorietà della immunità ottenuta con la iniezione profilattica di siero, già *E. v. Behring* ha tentato di immunizzare attivamente verso la tossina difterica, onde assicurare in tal modo una immunità di più lunga durata. L'iniziativa di *Behring* fu seguita in grande stile in America, ma allora si era considerata troppo ottimisticamente la possibilità «di estirpare la difterite». Oggi siamo divenuti più modesti, soprattutto in questi ultimi anni dopo la comparsa della difterite maligna. I problemi della vaccinazione preventiva risollevarono di nuovo gli altri problemi relativi all'essenza e alla misura della immunità verso la difterite, e molto già si è ottenuto con la nozione, che questi quesiti sono di assai difficile soluzione.

Sappiamo oggi che nella grande maggioranza dei bambini si formano spontaneamente antitossine verso la tossina difterica e con l'avvento della pubertà la immunità verso la difterite si fa, in linea percentuale, quasi uguale a quella degli adulti. È dibattuto e del resto di importanza secondaria, se questa maturazione sierologica - secondo *v. Groer* e *Hirszfeld* - si faccia spontaneamente, ossia senza lo stimolo immunizzatore di infezioni latenti da bacilli della difterite, oppure in conseguenza di infezioni latenti. Importante il fatto, che con la immunizzazione attiva interveniamo in questo avvenimento, e si è ben presto imparato che l'età è di importanza decisiva per il successo della

vaccinazione preventiva. Quanto maggiore è l'età dei bambini, tanto migliore il risultato: d'altra parte la statistica di morbidità insegna che quanto più giovani sono i bambini, tanto più sono recettivi alla difterite. Donde la norma di praticare l'iniezione preventiva nella più tenera fanciullezza, in ogni modo prima dell'età scolare; mentre d'altra parte è noto che nessun mezzo è coronato dal successo in tutti i casi.

Quanto più giovane è il bambino, tanto più energicamente agiscono gli stimoli immunitari, per stimolare il processo della formazione dell'antitossina; quanto maggiore è l'età del bambino, tanto minore deve essere in genere lo stimolo; talvolta basta anzi la sola prova di *Schick*.

Ma ad onta della più forte stimolazione immunizzatrice, una parte dei bambini rimane apparentemente refrattaria, ossia non si riesce a dimostrare antitossina in quantità misurabile. Si crede di dover ammettere, che questi bambini rimangano recettivi alla difterite, ma non lo si sa con certezza, perchè soltanto una parte di essi ammala e d'altra parte possono ammalare anche quelli nei quali l'antitossina è dimostrabile.

Il procedimento più usato per distinguere i bambini immuni verso la difterite da quelli recettivi, è la prova di *Schick*. La quantità di tossina difterica, che si usa per la prova di *Schick*, è fissata empiricamente. Se l'esito è negativo essa dimostrerebbe che il soggetto relativo ha per lo meno $\frac{1}{30}$ U. I. pro cc. di sangue. Questa però è una regola praticamente utilizzabile, ma non una legge; ad es. negli animali questo rapporto è tutto diverso, e sicuramente è vario anche tra gli uomini.

Una grande difficoltà sta nella preparazione e nella misurazione della tossina usata per la prova di *Schick*. Finchè non potremo ottenere la depurazione chimica di essa, dobbiamo usare come così detta tossina, il filtrato di cultura in brodo, e si sa che nessun numero di serie di una tossina è esattamente uguale a un altro. Tuttavia, scegliendo attentamente la tossina per la prova di *Schick* è possibile di fare questa ultima con sufficiente esattezza. Si è attualmente in grado di preparare allo stato secco la tossina difterica occorrente per la prova di *Schick*. In tal modo si è ottenuto un mezzo di misura non ulteriormente perfezionabile per esattezza.

Il quesito è di sapere se quanto si crede di determinare mediante la prova di *Schick* è anche una misura della immunità in atto contro la difterite; e a questa domanda si deve rispondere negativamente.

Per quanto, secondo i dati dell'esperienza, non ogni bambino *Schick*-positivo

ammala di difterite quando abbia possibilità di contagio, tuttavia, sono molto numerose le osservazioni di bambini Schick-negativi che ammalarono di difterite, persino tra quelli il cui titolo di antitossina del sangue determinato col metodo di *Römer* risultò di 1 e più U. I. per cc. A ciò si aggiungono le più recenti e importanti osservazioni fatte da *C. Jensen* all'Istituto statale danese.

Secondo queste constatazioni ci sono dei bambini, che per natura sono Schick-negativi. In questi bambini, talvolta anche in quelli che erano divenuti Schick-negativi mediante la immunizzazione attiva, una assai diligente titolazione del contenuto in antitossina del sangue fatta con saggi sugli animali dimostrò che non era presente antitossina, o almeno molto al di sotto di $\frac{1}{200}$ U. I. pro cc. Bambini Schick-negativi con un titolo al di sotto di $\frac{1}{100}$ U. I. non sono affatto rari (14 % secondo *C. Jensen*). Forse tali bambini sono ricettivi alla difterite, e la sola misura finora utilizzabile per riconoscerli, sarebbe la titolazione dell'antitossina nel sangue mediante esperienze sugli animali, il che per altro non si può fare quando si tratta di vaccinazioni in massa, e non darebbe neppure una garanzia assoluta di immunità.

L'immunità è un alcun che di vivente, soggetto a varianti dipendenti da varie influenze che ancora non conosciamo di sicuro. Il titolo in antitossina è soltanto un fenomeno parziale. Un bambino con titolo relativamente alto e Schick reazione negativa può forse ammalare di difterite maligna più rapidamente di un bambino che presenta bensì Schick reazione positiva, ma che possiede una facoltà costituzionale che gli permette di reagire allo stimolo specifico più piccolo da parte dei bacilli difterici con la formazione di antitossine sufficienti.

Ad onta di ciò non possiamo fare a meno - in mancanza di meglio - della prova di *Schick*. Ma si dovrebbe per una prevenzione ben condotta immunizzare senza eccezione tutti i piccoli bambini, e fare una cernita con la prova di *Schick* soltanto tra i bambini più grandicelli.

Molti sistemi abbiamo attualmente per la vaccinazione preventiva, e il pro e il contro che di ogni metodo si può dire, rende opportuno di distinguere da caso a caso quale sia meglio di applicare. Il preventivo ideale, che sia del tutto privo di pericolo, senza manifestazioni locali e generali, dia una immunità sicura in quasi il 100 % dei casi, rapida e di lunga durata, non è peranco noto.

Cronologicamente sono al primo posto le miscele di tossina-antitossina, che dapprima si usavano soltanto con tossina non completamente neutralizzata e piccolo eccesso di tossina, in seguito però anche neutralizzate e iperneutralizzate. La vaccinazione in grande stile è stata applicata in America con miscela iponeutralizzata.

In origine ci si era raffigurata la costituzione di una miscela tossina-antitossina iponeutralizzata in questo modo, che accanto a tossina completamente neutralizzata fosse presente una certa quantità di tossina libera, non neutralizzata e che questa piccola quantità di tossina provocasse l'ictus necessario per la immunizzazione. Per questa ragione fu preferita la tossina-antitossina iponeutralizzata. Ed effettivamente sembra, secondo le esperienze fatte finora, che la tossina - antitossina allo stato di miscela iponeutralizzata sia in grado di immunizzare meglio, ossia più rapidamente che allo stato neutralizzato, e certamente meglio che in quello iperneutralizzato, nel quale, a partire da un determinato eccesso di antitossina in su, viene piuttosto inhibita la produzione di una immunità attiva. Ma oggi dovremmo ammettere che in tutte le miscele tossina - antitossina tutta l'antitossina è legata alla tossina e tutta la tossina all'antitossina. Questa legatura è dissociabile, e nell'organismo avviene appunto una tale dissociazione, tanto più quanto più iponeutralizzata è la miscela e quanto più precocemente essa viene usata. Col tempo tutti i composti di tossina - antitossina diventano più saldi, e con ciò viene diminuita la loro dissociabilità e il loro effetto immunitario.

Questa influenza del tempo si appalesa nel modo più spiccato nella tossina-antitossina iponeutralizzata, specialmente se per la sua preparazione viene usato un siero fresco. Di conseguenza la tossina-antitossina iponeutralizzata si mantiene attiva soltanto per breve tempo, al massimo per otto settimane. Più a lungo si mantiene attiva la miscela tossina-antitossina neutralizzata.

Il fatto, che le miscele tossina-antitossina sono attive nella misura della tossina che se ne separa, comporta che dette miscele possono provocare effetti irritativi locali variabili, che per altro sogliono mantenersi in limiti tollerabili.

Siccome la quantità delle miscele tossina-antitossina di siero è sempre tanto alta, anche se si usa un siero di elevato valore, che spesso fu constatata ipersensibilità verso il siero di cavallo usato, si usa abitualmente soltanto siero di capre, montoni o buoi. Col loro uso è escluso il pericolo di rendere ipersensibile il bambino verso una eventuale iniezione ulteriore di siero curativo equino.

Un altro svantaggio sta in ciò, che per la troppo forte reazione locale non si può iniettare una quantità di tossina troppo grande. Di conseguenza tutti i preparati tossina-antitossina devono essere iniettati parecchie volte, con intervalli, il che rende naturalmente più difficile la messa in opera della iniezione preventiva.

Era pertanto giustificato di andare alla ricerca di un vaccino che debba essere iniettato una sola volta. Ciò fu possibile soltanto quando si riescì a introdurre una quantità molto maggiore di tossina, ma legata saldamente e che richiede pertanto un tempo molto più lungo per separare la tossina.

Così fu creato il T. A. F., fondamentalmente esso pure una miscela di tossina-antitossina, ma in forma solida di fiocchi la-

vati che si producono con la riunione di miscele appropriate e titolate di tossina-antitossina e dopo la lavatura sono di nuovo sospesi in soluzione fisiologica di cloruro sodico.

Anche il T. A. F. accanto a dei vantaggi ha degli svantaggi. I vantaggi stanno in ciò, che il preparato non provoca reazioni locali o generali e che in molti casi, specialmente se si tratta di bambini grandicelli o del personale di assistenza, basta una sola iniezione. Ciò non può però venire generalizzato e l'esperienza ha dimostrato che nei ragazzi in età scolare, ossia in un'epoca di immaturità sessuale, di regola una sola iniezione non basta. Sarà bene dunque in tali casi di iniettare due o tre volte, il che è tanto più agevole in quanto che la iniezione non suole dare disturbo. È soltanto raccomandabile di intercalare, quando si usa il T. A. F., intervalli più lunghi, data la lentezza con la quale l'effetto si produce. E con ciò veniamo agli svantaggi del preparato.

Con nessun altro profilattico una immunità attiva dura così a lungo come con il T. A. F.; tuttavia questa circostanza non ha importanza per una iniezione profilattica in periodi senza difterite.

Il T. A. F. deve essere preparato dal siero di cavallo, perchè soltanto il siero di cavallo si presta per la preparazione di flocchi. La quantità di albumina che si trova in 1 cc. del vaccino è al massimo di gr. 0,0001. Se questa quantità basta, secondo quanto insegna l'esperienza, per sensibilizzare verso una reiniezione una cavia altamente sensibile, quanto si constata negli animali non può essere senz'altro trasportato all'uomo. In genere gli uomini non sono facilmente sensibilizzati, e ci sono centinaia di esempi di uomini ai quali è stato in passato iniettato siero di cavallo per difterite e ai quali si sono in seguito praticate, anche intravene, iniezioni di siero di cavallo (per scarlattina, infezioni streptococciche, dissenteria, tetano ecc.), senza che essi presentassero fenomeni di shock. Naturalmente ci sono dei soggetti, che si sensibilizzano facilmente verso vari allergeni, e tra essi anche verso l'albumina di cavallo, ed è possibilissimo che mangiando carne di cavallo giunga in circolo più albumina equina genuina di quanto ne contenga una dose di T. A. F. Ma soltanto pochi soggetti particolarmente predisposti potranno venire così sensibilizzati. Nella pratica della immunizzazione con T. A. F. non si osservano disturbi da ipersensibilità.

I reperti di *Bernhardt*, secondo i quali nei bambini immunizzati con T. A. F., una iniezione di siero di cavallo fatta eventualmente più tardi (ad es. in casi di scarlattina) si osserva con particolare frequenza la malattia da siero, non valgono a far ritenere la iniezione pregressa di T. A. F. come veramente responsabile. Non il numero dei casi di malattia da siero, perchè esso è in rapporto anche con altri fattori, bensì la comparsa particolarmente precoce della malattia da siero parlerebbe in favore di una sensibilizzazione, mentre il periodo di tempo di una settimana e oltre rientra perfettamente nel grado normale della malattia da siero. Il caso di shock dopo iniezione intramuscolare di siero di cavallo, quattro settimane dopo una iniezione di T. A. F. così riferito da *Epstein e Klein* (1931) è certamente eccezionale, (*Bernhardt* non vide shock in alcuno dei suoi casi) e riguarda con grande probabilità un bam-

bino che soltanto per predisposizione costituzionale fu sensibilizzato con gr. 0,0001 di albumina in modo quale non si vede nell'uomo con una dose simile. Nella pratica della iniezione preventiva non si deve tener conto di tali casi di eccezione in vista della possibilità, in occasione di una eventuale reiniezione successiva di siero, di riconoscere (prova intracutanea) la ipersensibilità in atto, ed evitare lo schock.

Comunque, anche praticando iniezioni intramuscolari di alte dosi di siero si dovrebbe sempre pensare alla possibilità, che in modo puramente meccanico, per l'apertura di fessure linfatiche ampie, si abbia un assorbimento rapido del siero, e fare in tali casi la prova intracutanea. Nel caso di *Epstein* e *Klein* si sarebbe riconosciuta in precedenza la elevata ipersensibilità.

Resta la speranza di potere in futuro eliminare anche questo svantaggio inerente al T. A. F. mediante la su ricordata modificazione chimica dell'albumina del siero.

Il metodo di iniezione profilattica al quale forse spetta il primato in futuro, è quello dell'anatossina o formoltossoide, introdotto da *Löwenstein*, *Glenny* e *Ramon*. Tutte le prove d'immunizzazione fatte finora con questo metodo hanno dimostrato che può essere applicato senza preoccupazioni. Esso ha il grande vantaggio dell'atossicità; sperimentalmente non si è finora neppure riusciti a rendere di nuovo tossica una tossina detossicata col formolo. Il metodo sarebbe quindi un metodo ideale, se non avesse lo svantaggio di provocare reazioni dolorose al luogo della iniezione, che sono scarse o nulle nei bambini piccolissimi, ma spiccate nei bambini grandicelli e negli adulti. Di conseguenza, ad onta dell'atossicità del rimedio, non se ne può introdurre in una sola volta quanto sarebbe necessario per ottenere una immunità sufficiente, e si devono fare tre iniezioni con intervalli e dosi aumentanti.

Gli studi di *S. Schmidt* da Copenhagen, il quale ha applicato all'anatossina il metodo di *Willstätter* della depurazione con fermento, fanno legittimamente sperare che questo lato sfavorevole dell'anatossina possa essere eliminato. Si riesce effettivamente ad ottenere preparati di anatossina di alta concentrazione e molto depurati, ma le ricerche fatte finora in Danimarca su bambini, ai quali si fece una sola iniezione di anatossina altamente attiva, hanno dimostrato (*C. Jensen*) che anche così facendo non si può ottenere la immunità nel 100 % dei casi. Restano alcuni casi refrattari, per i quali si deve ammettere una impossibilità costituzionale a formare antitossina. Ulteriori ricerche dovranno dimostrare, se la depurazione non abbassi il potere immunizzante, che potrebbe essere rilevato soltanto con una concentrazione la quale renderebbe il preparato più caro.

Un altro vantaggio di tutti i formoltossoidi è la loro lunga conservabilità, la quale è notevolmente maggiore di tutti gli altri preparati di tossina-antitossina.

Dopo che la immunizzazione di cavalli allo scopo di ottenere siero ebbe dimostrato il grande valore della formazione di un deposito sottocutaneo dell'antigene e che l'applicabilità dei preparati in fiocchi dipende certamente in parte dalla loro azione di deposito, si è anche cercato di rendere floccosa l'anatossina mediante sali di alluminio e di ottenere da questi fiocchi dei preparati (*Glenny*), coi quali si può bensì ottenere una immunità sufficiente mediante una sola iniezione, ma che, secondo quanto si è visto finora, danno reazioni locali dolorose.

Tutti i preparati fin qui elencati per la immunizzazione preventiva devono essere iniettati. Ma in pratica si incontrano molti ostacoli alla profilassi con iniezioni, sicchè pei piccoli bambini un preparato che agisse introdotto per altra via avrebbe certamente un grande successo. Finora non si è riusciti a praticare una immunizzazione per via orale. È anche inverosimile che anche in futuro se ne possano ottenere dei risultati, benchè l'ultima parola in riguardo non sia stata detta. Numerosi furono i tentativi per immunizzare per via percutanea.

Il merito di avere per primo portato nella pratica questo metodo spetta a *Löwenstein*, che credette di avere ottenuto buoni risultati con un unguento contenente anatossina, da frizionare nella pelle previamente sgrassata.

La praticità di questo metodo fu in seguito confermata da *Stransky*, *Isabolinski*, *Jakopp*, *Nobel* e altri, ma energicamente negata dalla maggior parte degli studiosi, che fecero anche ricerche sugli animali (*Otto*, *Kolle*, *S. Schmidt* e altri).

Questi risultati contraddittori si possono in parte spiegare con le differenze del materiale usato, ossia con l'età e la maturità sierologica dei bambini trattati. Forse anche in parte per differenze di tecnica. Tuttavia si dovrebbe essere cauti nel dedurre in base a esperimenti non riusciti su animali, la inefficacia del metodo, perchè la pelle umana è un organo assai diverso della pelle degli animali. Le ricerche di immunizzare mediante unguento contenente anatossina non devono essere considerate come chiuse (*Bürgers*), anche se i risultati ottenuti finora non sono molto incoraggianti.

Vediamo dunque che attualmente soltanto le miscele di tossina e antitossina, il T. A. F. e il formoltossoide (anatossina),

vengono in discussione per la pratica, e che dai vantaggi e dagli svantaggi di questi preparati derivano le direttive seguenti per la scelta di un profilattico.

Una prevenzione immediata è data soltanto dalla iniezione di siero.

Se si vuol far seguire alla immunità passiva, che cessa dopo alcune settimane, una immunità attiva, occorre tener presente che si deve dapprima attendere che la immunità passiva sia cessata, perchè nel periodo di attività di essa l'organismo si lascia immunizzare attivamente con difficoltà. L'effetto è paragonabile alla iniezione di T. - A. troppo iperneutralizzata. Inoltre bisogna tenere presente che non si deve usare un preparato che contenga lo stesso siero che si è usato per la immunizzazione passiva. Se ad es. si è praticata al bambino una iniezione profilattica di siero con siero antdifterico dal bue, non sono subito usabili dei preparati di tossina - antitossina ottenuti da siero di bue, perchè in un caso di questo genere sarebbe, per motivi biologici, inibita una immunità attiva.

In un caso di questo genere si dovrebbe usare T. A. F. (preparato con siero di cavallo) o anatossina.

Se si vuol praticare una immunizzazione attiva in bambini, si deve soprattutto tener conto dell'età. Ai bambini sotto ai 10 anni è bene di somministrare tossina - antitossina iponeutralizzata oppure neutralizzata, alla dose di 3 iniezioni, oppure T.A.F. con almeno due iniezioni. L'anatossina deve essere data, per le reazioni che provoca, soltanto a bambini fino a 6 anni e del pari in tre iniezioni. (Quando si avrà maggiore esperienza sulle anatossine depurate, questo preparato potrà forse essere usato per tutti i bambini).

Per i bambini più grandicelli e per gli adulti è meglio di usare la T. A. F. Nei ragazzi al di sopra dei 14 anni e negli adulti dovrebbe bastare una iniezione. La immunizzazione si compie nel modo più rapido con l'anatossina, nel modo più lento col T. A. F.

Riguardo al giudizio dei risultati di una vaccinazione preventiva, abbiamo visto che la prova di *Schick* di regola si fa negativa nei bambini antecedentemente positivi, ma che essa non è misura assolutamente sicura per una sufficiente immunità verso la difterite. Anche la determinazione del titolo dell'antitossina nel sangue non permette di misurare la immunità potenziale, ma soltanto uno stato temporaneo di immunità. L'immunità è troppo complessa per poter essere fissata soltanto in base a uno degli elementi variabili.

Il solo dato sicuro per giudicare il risultato di una immunizzazione preventiva è il confronto statistico della morbidità prima e dopo, e ciò anche soltanto se il tipo della difterite non si è fatto più benigno ma si è mantenuto uguale o anzi è peggiorato. Basandosi su questo elemento di giudizio, le vaccinazioni praticate su larga scala a Berlino nel 1928 hanno dato risultati (*Seligmann*) che giustificano di continuare con queste direttive.

Vediamo dunque che qualche cosa si è ottenuto, ma che resta molto, anzi moltissimo da fare. Tuttavia potremmo chiamarci fortunati, se avessimo per altre malattie infantili, ad es. per la pertosse, che fa un numero maggiore di vittime della difterite e della paralisi infantile, armi di lotta pari a quelle che abbiamo per la difterite.

Letteratura: Alcuni lavori recenti.

Jürgens: Med. Welt 1931, Nr. 10 e 11.

v. Albertini: Schweiz. med. Wschr. 1932, 745.

Benedict: Klin. Wschr. 1932, 1549.

J. Hirsch: Zeitschr. f. Hyg. 1932, 114, 195.

Vortrag bei der Tagg. d. Dtsch. mikrobiol. Ges. in Giessen 1932.

A. Hottinger: Ueber die maligne, sog. toxische Diphtherie. S. Karger, Berlin 1932.

U. Friedemann: Deutsche med. Woch. 1932, Nr. 42 e 43.

J. v. Bokay: Ergeb. d. inn. Med. 1932, Vol. 42 e 43.

Soprarenina e composti affini nella anestesia locale

DR. O. SCHAUMANN

Dall'Istituto farmacologico della I. G. Farbenindustrie A. G.,
Werk Hoechst.

Benchè l'uso dell'anestesia locale abbia trovato rapidamente numerosi fautori, specialmente per i piccoli interventi, in vista dei suoi grandi vantaggi rispetto alla narcosi generale, tuttavia potè avere applicazione generale soltanto quando *Braun* introdusse nell'anestesia locale la combinazione con la Soprarenina. La maggiore profondità e la maggiore durata dell'anestesia ottenute mediante l'aggiunta di piccole quantità di Soprarenina e la sostituzione della cocaina, non esente da pericoli, con la Novocaina, assai meno tossica, resero anzi possibile di praticare in semplice anestesia locale anche operazioni più importanti. Mediante l'azione vasocostrittrice della Soprarenina, l'anestetico locale permane più a lungo al luogo della iniezione; ciò comporta due vantaggi: l'anestesia dura più a lungo e il pericolo di una intossicazione per assorbimento dell'anestetico viene ridotto a un minimo. Nell'anestesia superficiale, specialmente in quella della mucosa nasale, si svolge inoltre di pari passo un effetto ischemizzante e detumefacente.

Valga il seguente esempio ad illustrare l'effetto detossicante dell'aggiunta di Soprarenina.

Detossicazione della Pantocain mediante aggiunta di Soprarenina, nell'iniezione sottocutanea al coniglio.

Dose in mgr. pro Kg.	Aggiunta di So- prarenina a gocce pro 100 cc.	Risultati
40	2	Dopo 45 minuti paralisi respirat. ed esito
40	5	Dopo 45 minuti paralisi respirat. ed esito
50	10	Giace sul lato, leggere convulsioni, tutti (3) sopravv.
70	20	Giace sul lato, leggere convulsioni, sopravvive
100	30	Grave avvelenamento, sopravvive
100	50	Giace sul lato, senza convulsioni, sopravvive

Con l'aggiunta di 10 gocce di soluzione di Soprarenina a 1:1000 a 100 cc. di soluzione al 0,5 % di Pantocain, il coniglio tollera dunque sottocute il doppio della dose letale, che è per la Pantocain di circa 20 mgr. pro Kg.; con 50 gocce di Soprarenina a 1:1000 aggiunte a 100 cc. della stessa soluzione la dose letale sottocutanea è il quintuplo di quella altrimenti letale. Questo effetto detossicante dell'aggiunta di Soprarenina spiega anche l'apparente aumento di tossicità di soluzioni di Novocaina-Soprarenina ossidate, coloratesi in giallo (*Langecker*). In conseguenza della distruzione della Soprarenina in queste soluzioni, cessa l'effetto inibitorio della stessa sull'assorbimento e la tossicità della soluzione sale in modo evidente con l'iniezione s. c.; per contro con l'iniezione i. v. o con quella i. p., nelle quali non è più in giuoco l'influenza della Soprarenina sulla velocità di assorbimento, la tossicità piuttosto diminuisce. Questo effetto puramente meccanico della Soprarenina, la fissazione dell'anestetico al luogo della iniezione, non dovrebbe però essere la sola causa della maggiore profondità dell'anestesia; si deve piuttosto ammettere con *Rentz*, che la Soprarenina rende in certo modo più sensibili all'anestetico le terminazioni nervose.

La Soprarenina ha dunque essenzialmente contribuito alla vittoria dell'anestesia locale, ma essa presenta taluni svantaggi. In qualità di diossifenolo basico la Soprarenina risente facilmente le influenze ossidanti. Il suo primo prodotto di ossidazione, l'«omega» di *Bruno Kisch*, è in conseguenza della sua probabile struttura chinoide una sostanza molto esposta a reazioni e assai attiva come assorbente idrogeno. Le soluzioni di Novocaina - Soprarenina lasciate alla luce cominciano, a meno che non si siano aggiunti congrui stabilizzatori, a farsi gradatamente gialle, mentre in pari tempo perdono di efficacia. E' molto verosimile che si tratti di una qualche legatura chimica tra la Novocaina e il prodotto chinoide di ossidazione della Soprarenina.

Oltre a questa sgradita proprietà, che più che altro è un

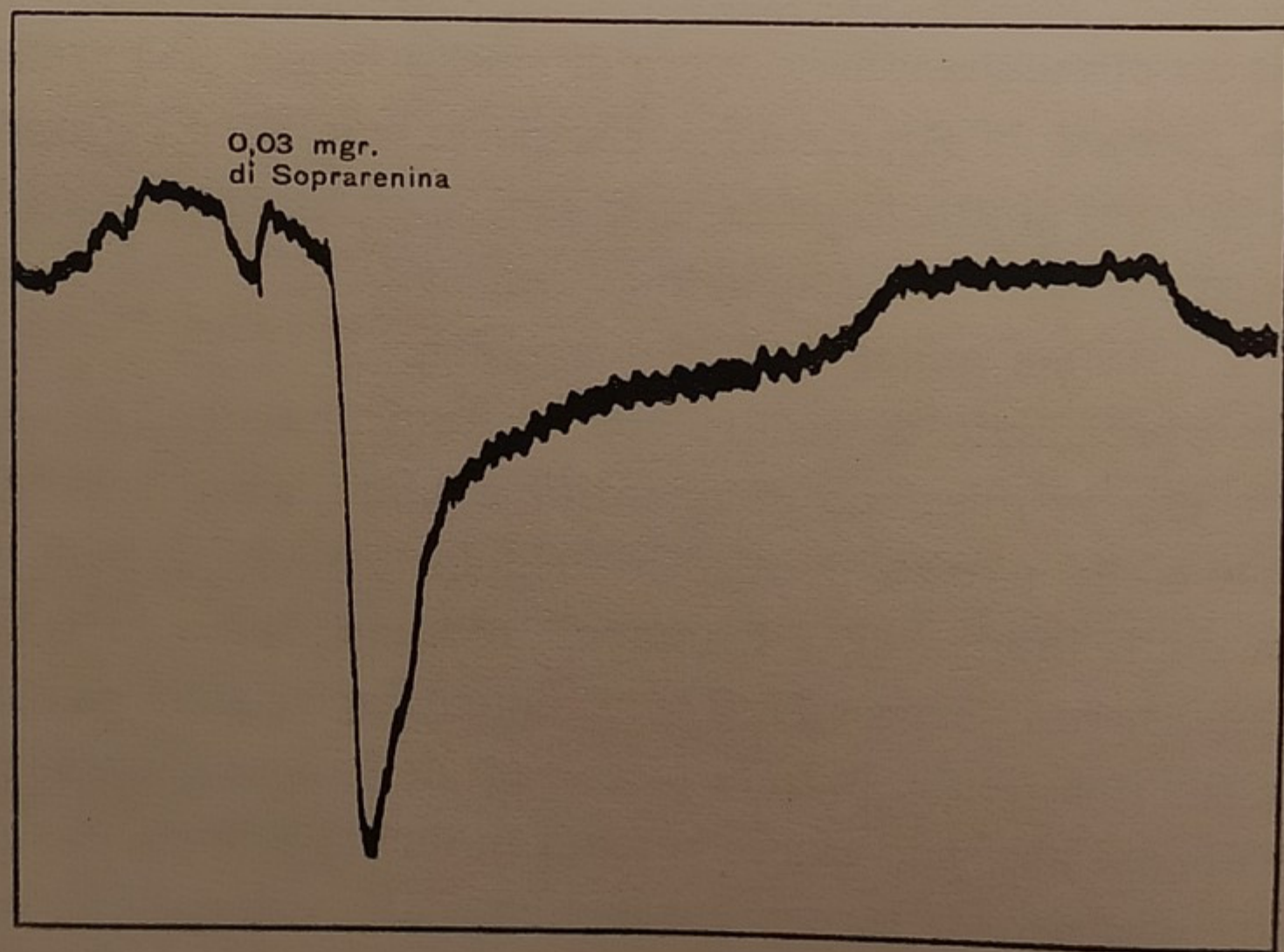
problema di tecnica chimica e forse comporta anzi il vantaggio di mettere in guardia dall'uso di soluzioni non più ineccepibili, la Soprarenina può esplicare in date circostanze, oltre all'effetto locale desiderato, anche un effetto generale indesiderato.

Per quanto la Soprarenina, data la sua azione vasocostrittrice locale, si chiuda da sè la via verso il grande circolo, tuttavia può accadere che per casuale iniezione intravenosa o perchè l'iniezione è fatta in tessuto infiammato o per altre ragioni molto irrorato, una parte di essa, sufficiente a dare effetti accessori indesiderati, giunga in circolo. Per lo più questi fenomeni generali - del resto rari - si limitano a palpitazioni, cefalea, sudorazione, tremore delle mani ecc., fenomeni che sono generalmente riconosciuti come dovuti alla Soprarenina e non allo anestetico locale; ma ci sono dei soggetti che sono particolarmente predisposti a tali effetti accessori della Soprarenina. Non accenno qui tanto ai soggetti con tireotossicosi spiccata, la cui maggiore sensibilità alla Soprarenina è nota e dovuta alla iper- o meglio alla disfunzione della tiroide; neppure ai soggetti con circolo compromesso nei quali un ulteriore peggioramento dell'apparato circolatorio per opera di una sostanza così attiva sul circolo come è la Soprarenina comporta con sè un grande rischio. Intendo piuttosto parlare di quei soggetti apparentemente del tutto normali che rispondono con stato di collasso all'apporto di minime quantità di Soprarenina.

E' sorprendente di vedere come questi fenomeni s'avverino proprio con la iniezione di quantità minime, quali sono di uso corrente nella pratica dentistica e rinolaringologica. Data la pochezza degli interventi, i fenomeni accessori sono in tali casi particolarmente sorprendenti e parimenti spiacevoli per il medico e per il paziente. Data la piccolezza delle dosi usate la causa dei fenomeni non può essere cercata in una deficienza del cuore per sovraccarico di lavoro conseguente alla coartazione vasale periferica; si deve piuttosto trattare di un processo di genesi centrale. Fenomeni simili si possono provocare anche negli ani-

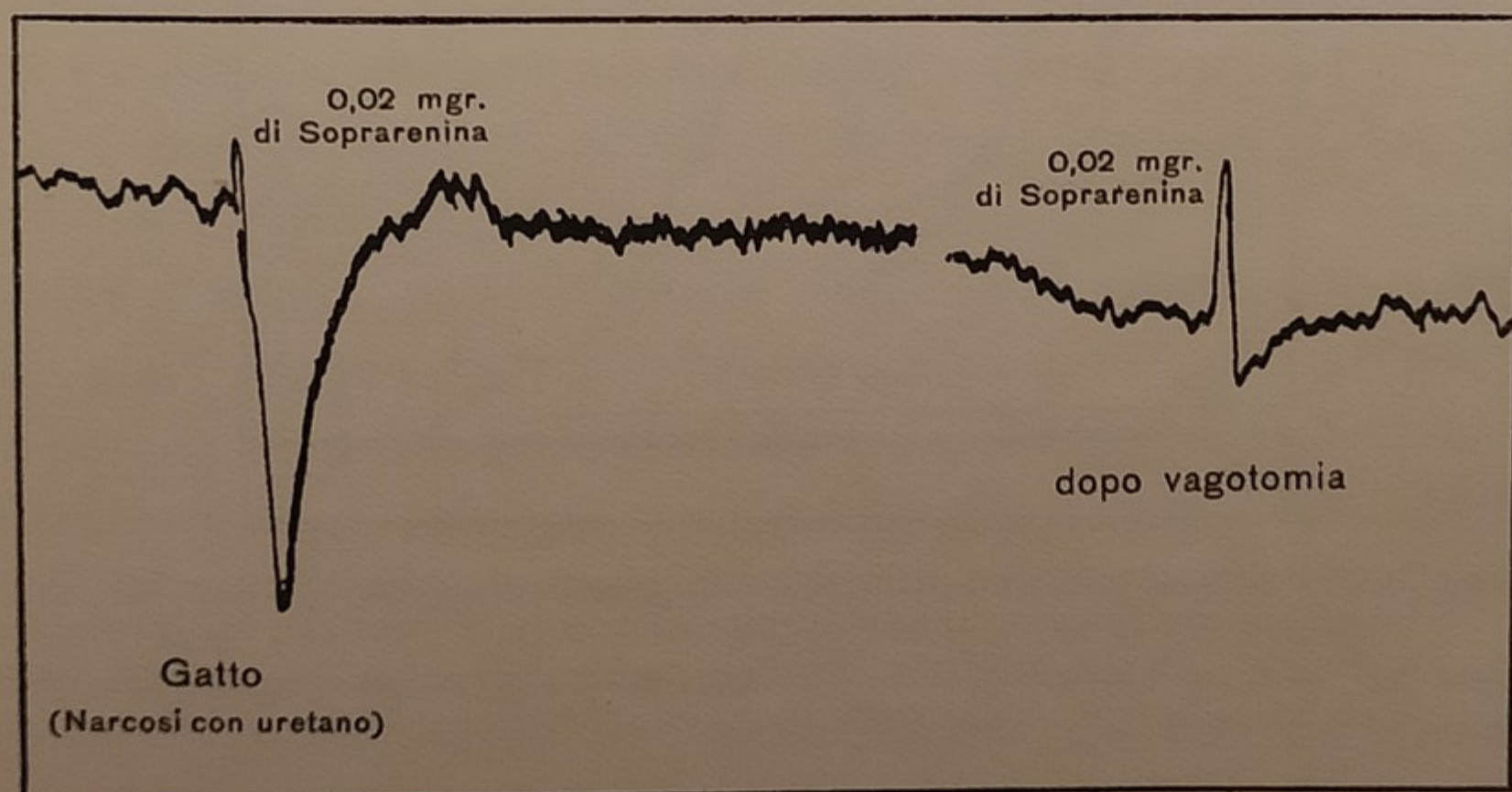
mali da esperimento. Mentre cioè la Soprarenina ad alte dosi ha soprattutto per effetto di aumentare la pressione sanguigna, in certe circostanze si osservano effetti opposti.

E' noto che la Soprarenina a dosi piccolissime può provocare nei gatti e nei cani piccoli abbassamenti della pressione sanguigna, i quali dovrebbero trovare spiegazione in ciò, che oltre ai vasocostrittori simpatici ci sono anche dilatatori stimolabili con la Soprarenina, un concetto che sostenne già *Dale* e fu ripreso recentemente da *Burn*. Secondo le ricerche di *Hartmann*, *Gruber*, *Dale* e *Richards* ed altri, confermate da *Rein* sono soprattutto i vasi dei muscoli che si dilatano per effetto di piccole dosi di Soprarenina. Oltre a questo piccolo abbassamento della pressione sanguigna si possono provocare negli animali, in condizioni di esperimento appropriate cadute collassiche della pressione che non possono essere spiegate nel modo su ricordato. Tali brusche cadute della pressione possono ad es. essere provocate con dosi medie di Soprarenina nei gatti in narcosi uretanica e con pressione alta. Un esempio del genere è illustrato dalla curva 1.



Curva 1: Gatto di 3 Kg. Narcosi da Uretano. Caduta brusca, di 90 mm. Hg, della pressione sanguigna dopo 0,03 mgr. di Soprarenina, senza previo aumento della pressione stessa.

Riguardo al meccanismo di questi fenomeni non si possono per ora formulare che delle ipotesi più o meno fondate. Ad una dilatazione vasale periferica direttamente provocata dalla Soprarenina non è il caso di pensare; gli abbassamenti sono troppo spiccati e troppo improvvisi. Neppure si può pensare ad una vasodilatazione esagerata di natura regolarizzante riflessa per il tramite del seno carotideo (nel senso delle ricerche di *Hering*) perchè l'aumento della pressione che precede all'abbassamento ed eventualmente provoca l'abbassamento riflesso è troppo piccolo e può spesso mancare del tutto. Resta soltanto la possibilità che la Soprarenina sia causa diretta di un processo centrale ipopressorio. Come via efferente si deve pensare in prima linea al vago, tenendo conto del rallentamento del polso che si accompagna all'abbassamento della pressione, della spiccata peristalsi intestinale che si produce, in luogo della inibizione che normalmente sarebbe da attendersi dalla Soprarenina, e della mancanza totale o quasi dell'abbassamento della pressione dopo sezione del vago o atropinizzazione (curva 2 e 3).

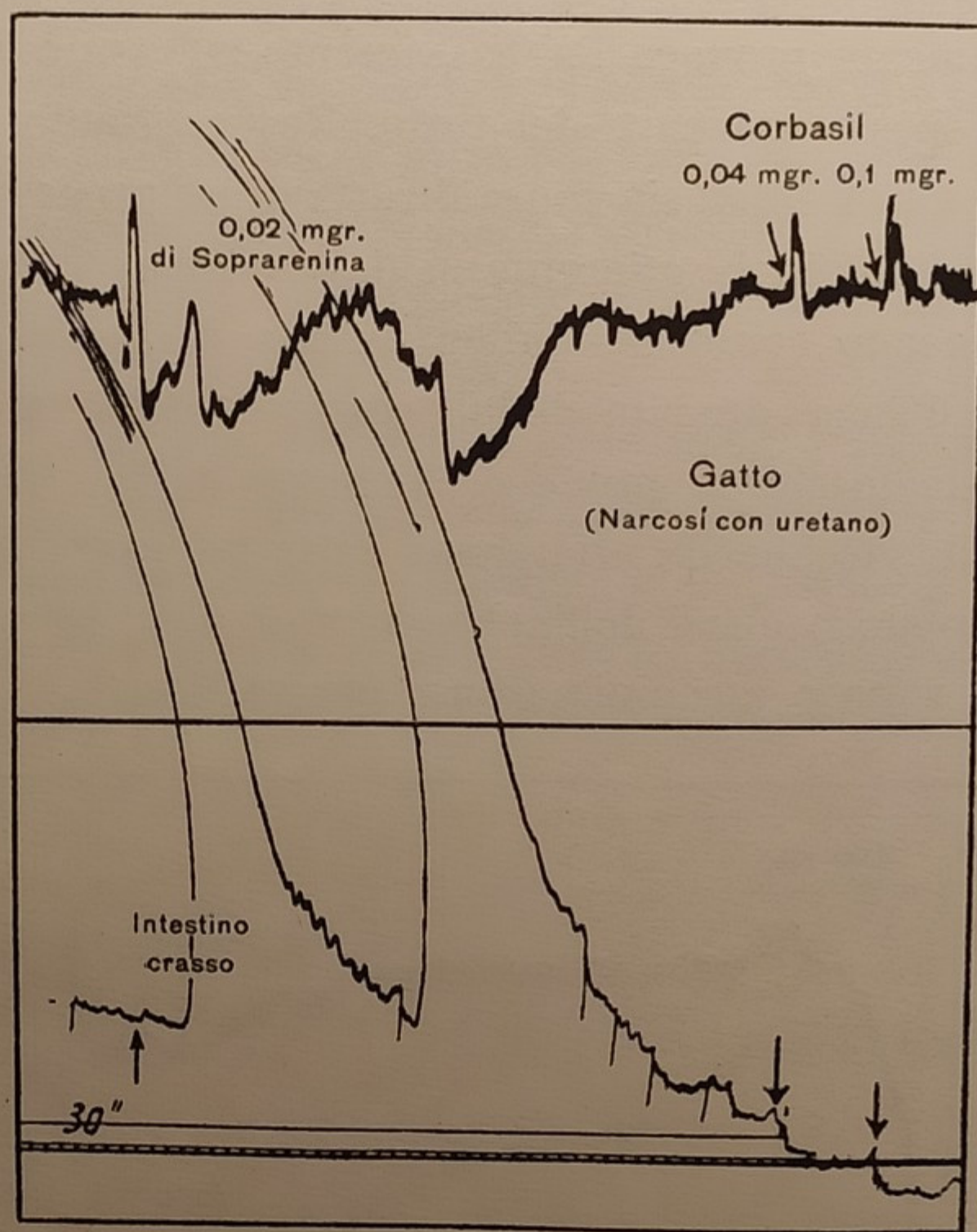


Curva 2: Dopo vagotomia la caduta della pressione sanguigna non si produce.

Non si può ammettere un'azione periferica sul vago - alla quale si potrebbe pensare in base all'azione amfotropa della Soprarenina da taluni affermata - perchè se così fosse essa non

dovrebbe essere eliminata colla vagotomia. Nel modo più soddisfacente il fenomeno potrebbe essere spiegato con una stimolazione diretta del centro del vago. Che la Soprarenina eserciti questa azione centrale sul vago risulta dai lavori di *Heinekamp, Brown, Anrep e Segall*.

Dati questi effetti accessori della Soprarenina, era da lungo tempo sentito il bisogno di sostituirla nell'anestesia locale con



Curva 3: Spiccata stimolazione della peristalsi intestinale dopo 0,03 mgr. di Soprarenina con contemporanee ripetute cadute della pressione sanguigna.

Diossi-nor-Efedrina (Corbasil): 0,04 e 0,10 mgr. provocano soltanto un aumento minimo della pressione sanguigna con contemporaneo abbassamento del tono dell'intestino.

altre sostanze vasocostrittrici. Quando *Chen* scoprì l'azione pressoria dell'Efedrina, si cercò di sostituire con essa la Soprarenina; ma risultò ben presto che da questo punto di vista la Efedrina non esplica effetto paragonabile a quello della Soprarenina. *Read* dimostrò che la Efedrina è bensì in grado di raf-

forzare alquanto l'anestesia Novocainica, ma che questo effetto può essere ottenuto soltanto con concentrazioni relativamente alte e va ascritto non ad un'azione vasocostrittrice bensì piuttosto a un minimo potere anestetico che l'Efedrina svolge per sè stessa, stante che nella combinazione usuale di Novocaina-Soprarenina si potrebbe sostituire colla Efedrina la Novocaina piuttosto che la Soprarenina. Allo stesso risultato giunsero *Kochmann, Lundy*, nonchè *Stockton, Pace e Tainter*.

Con mie ricerche personali io ho fatto le stesse constatazioni e posso affermare che di tutte le ammine aromatiche designate come «prodotti di sostituzione della Soprarenina» nessuna è in grado di esplicare nell'anestesia locale un'azione anche solo qualitativamente simile a quella della Soprarenina. Nè la Efedrina, nè i suoi mono-ossi-derivati, nè i composti derivanti dalla Soprarenina, che hanno attaccato al nucleo benzolico soltanto un gruppo ossidrilico o non ne hanno attaccato alcuno, sono in grado di prolungare o rendere più profonda l'anestesia nell'esperimento del pomfo. Anche il sicuro effetto detumefacente della Efedrina o del fenilamminoetanolo va perduto quando le due sostanze si combinano alla cocaina (*Pace e Bacher*).

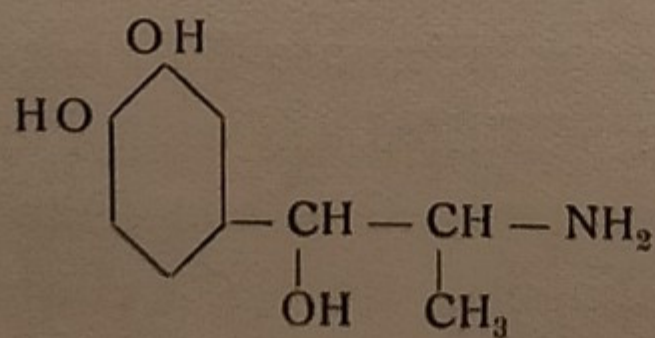
I lavori di *Tainter* danno spiegazione di questo fatto. Già *Fröhlich e Löwi* scoprirono che la cocaina è in grado di rafforzare l'effetto pressorio della Soprarenina; *Eggleston e Hatcher* dimostrarono che anche la Novocaina ha la stessa proprietà sia pure in misura minore della cocaina. *Tainter* e collaboratori constatarono poi che questa azione sensibilizzante della cocaina si svolge sulla Soprarenina, ma non sull'Efedrina e suoi composti affini. Ne dedusse che il meccanismo di azione della Soprarenina deve essere fondamentalmente diverso da quello degli altri composti su ricordati; ammise per la Soprarenina un meccanismo d'azione «simpaticotropo», per la Efedrina e simili, «muscolotropo». Con ricerche personali io ho confermato questi reperti e ho dato la dimostrazione che questa azione simpaticotropa è posseduta soltanto da quei composti che, come

la Soprarenina, contengono due gruppi ossidrilici-fenolici in posizione 3,4. Neppure i composti mono-ossidati hanno questa proprietà; tuttavia in essi esiste già, anche da un punto di vista farmacologico, una certa affinità col tipo Soprarenina.

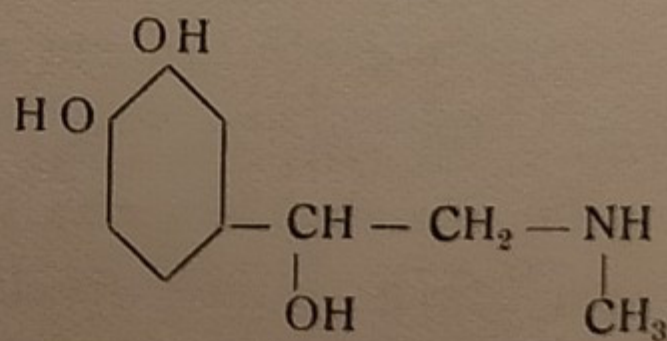
Mentre cioè l'azione sulla pressione sanguigna dell'Efedrina e dei composti senza ossidrile fenilico viene molto affievolita o senz'altro eliminata dalla cocaina, nei composti mono-ossidati essa viene poco o punto influenzata; più precisamente i composti divengono sempre più simili alla Soprarenina secondo la posizione del gruppo OH nell'ordine orto, para e meta. Ma un rafforzamento dell'effetto sulla pressione si ha soltanto colla presenza del secondo gruppo OH. Lo stesso dicasi per il prolungamento e il rafforzamento dell'anestesia locale; anche qui è presupposto essenziale la presenza di gruppi ossidrilici fenolici.

Sembra dunque esistere un rapporto reciproco tra anestetici locali e rimedi con azione sui vasi; quelle sostanze la cui azione sulla pressione sanguigna (ossia la cui azione sui vasi) è rafforzata dalla cocaina sono anche viceversa - verosimilmente per la stessa ragione - in grado di rafforzare l'effetto degli anestetici locali.

Orbene si è cercato di trovare tra questi composti un rappresentante che fosse in grado di sostituire la Soprarenina nell'anestesia locale senza avere di essa i su ricordati effetti accessori. La 3,4 diossi - nor - Efedrina (Corbasil) dalla formula



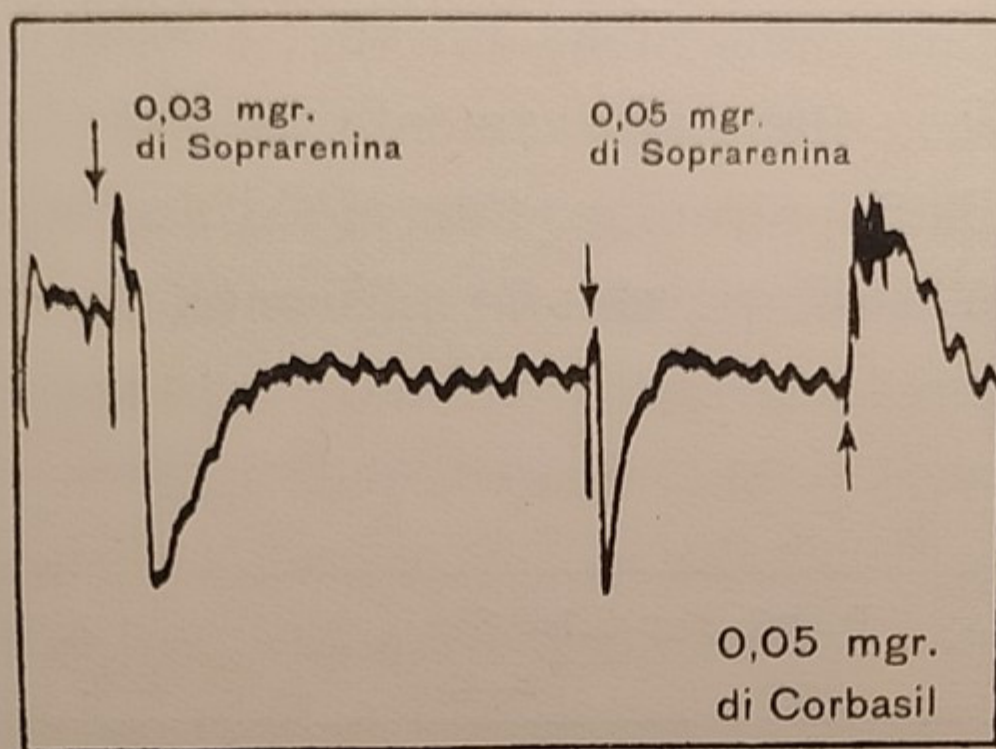
Diossi - nor - Efedrina (Corbasil)



Soprarenina

sembra rispondere a questi requisiti. Corrispondentemente alla sua stretta parentela con la Soprarenina, anche le sue proprietà farmacologiche sono assai simili a questa. Tuttavia sperimen-

tando sul gatto intossicato con uretano, risultò una differenza sorprendente. La su ricordata caduta brusca della pressione mancò o fu appena accennata (Curva 4).



Curva 4: 0,03 e 0,05 mgr. di Soprarenina provocano forti cadute della pressione sanguigna, mentre 0,05 mgr. di Diossi - nor - Efedrina (Corbasil) provocano soltanto aumento della pressione.

Ciò indusse a pensare che il preparato usato, che fosse in anestesia locale, non dovesse più provocare effetti accessori; le prove cliniche estese, specialmente in odontojatria, confermarono appieno questa supposizione. Anche dei pazienti i quali erano noti come sensibili e intolleranti alla Soprarenina, tollerarono l'anestesia locale senza il più piccolo effetto accessorio.

Anche nei cardiopatici e nei Basedowiani si poterono praticare anestesi locali senza spiacevoli fenomeni circolatori.

Ricordiamo qui i dati farmacologici più importanti della 3,4 diossi-nor-Efedrina, dei quali fu già riferito brevemente in altra sede ⁽¹⁾. Essa aumenta la pressione sanguigna nei gatti, nei cani e nei conigli; lo svolgimento della curva assomiglia assai a una curva di Soprarenina, ma è un po' più protratto. La precedente somministrazione di cocaina aumenta grandemente l'effetto sulla pressione sanguigna, l'ergotamina lo indebolisce e talvolta anzi abbassa la pressione.

(1) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 160, pagg. 148, 173.

L'intestino isolato viene inibito nella sua facoltà contrattile, l'utero di coniglio, stimolato. I vasi cutanei isolati dell'orecchio del coniglio vengono ristretti, l'attività del cuore di animali a sangue freddo o caldo viene stimolata. All'iniezione sottocutanea segue iperglicemia, ossia si ha un effetto assai simile a quello della Soprarenina. Quantitativamente, essa è da 5 a 10 volte meno attiva della Soprarenina. Con ciò si accorda anche la sua minore tossicità assoluta, che in raffronto alla Soprarenina è la seguente, secondo la specie animale e la via d'introduzione.

Dosi letali in mgr. pro Kg.:

Specie animale	Diossi - nor - Efedrina		Soprarenina	
	i. v.	s. c.	i. v.	s. c.
Topo	10—15	50—100	—	4—5
Ratto	8	—	0,15	—
Coniglio	1—2	—	0,1—0,2	—

Rapporto della tossicità tra diossi - nor - Efedrina e Soprarenina:

Topo s. c. da 1 : 10 a 1 : 20

Ratto i. v. 1 : 50

Coniglio i. v. 1 : 10

Ma in pratica, specialmente per l'anestesia da infiltrazione o di conduzione nell'ambito della bocca e del cavo naso-faringeo, questa tossicità assoluta non ha importanza decisiva, perchè le dosi che si usano sono sempre di pochi decimi di milligrammo.

Con l'esperimento del pomfo si stabilì che per ottenere una anestesia di pari effetto si deve adoperare una dose di diossi-nor-Efedrina 5-10 volte maggiore che di Soprarenina.

Durata media dell'anestesia completa di un pomfo cutaneo con 0,10 cc. di soluzione $\frac{1}{4}$ % di Novocaina con aggiunta di:

Soprarenina	
0,0005%	0,001%
53'	oltre 60'

Diossi - nor - Efedrina	
0,001%	0,0025%
18'	45'

Il controllo clinico della combinazione di Novocaina con diossi-nor-Efedrina dimostrò che la Soprarenina può essere so-

stituita con effetto pieno dalla nuova sostanza, e che, come già si disse, non si ha alcun effetto accessorio.

La sostituzione della Soprarenina col Corbasil nell'anestesia locale costituisce un'innegabile progresso, di cui fruiscono in pari misura i medici e i malati. Al paziente sono risparmiati gli effetti accessori relativamente innocui ma penosi che talvolta si producono; anche quei soggetti ipersensibili alla Soprarenina che finora, in base alla spiacevole esperienza fattane, rifiutavano l'anestesia locale per piccoli interventi, specialmente nel campo odontoiatrico, possono attualmente goderne i benefici. Al medico che non può sapere a priori se il paziente sia o no ipersensibile alla Soprarenina, viene risparmiata col Corbasil qualsiasi spiacevole sorpresa. Che se i fenomeni generali presentati dai soggetti sensibili alla Soprarenina per lo più scompaiono rapidamente, essi possono tuttavia disturbare assai gli interventi che il medico deve praticare.

Sostituendo la Soprarenina col Corbasil, medici e pazienti sono al riparo da tali spiacevoli incidenti.

Antipiretici e analgesici della serie pirazolonica.

DR. M. BOCKMÜHL

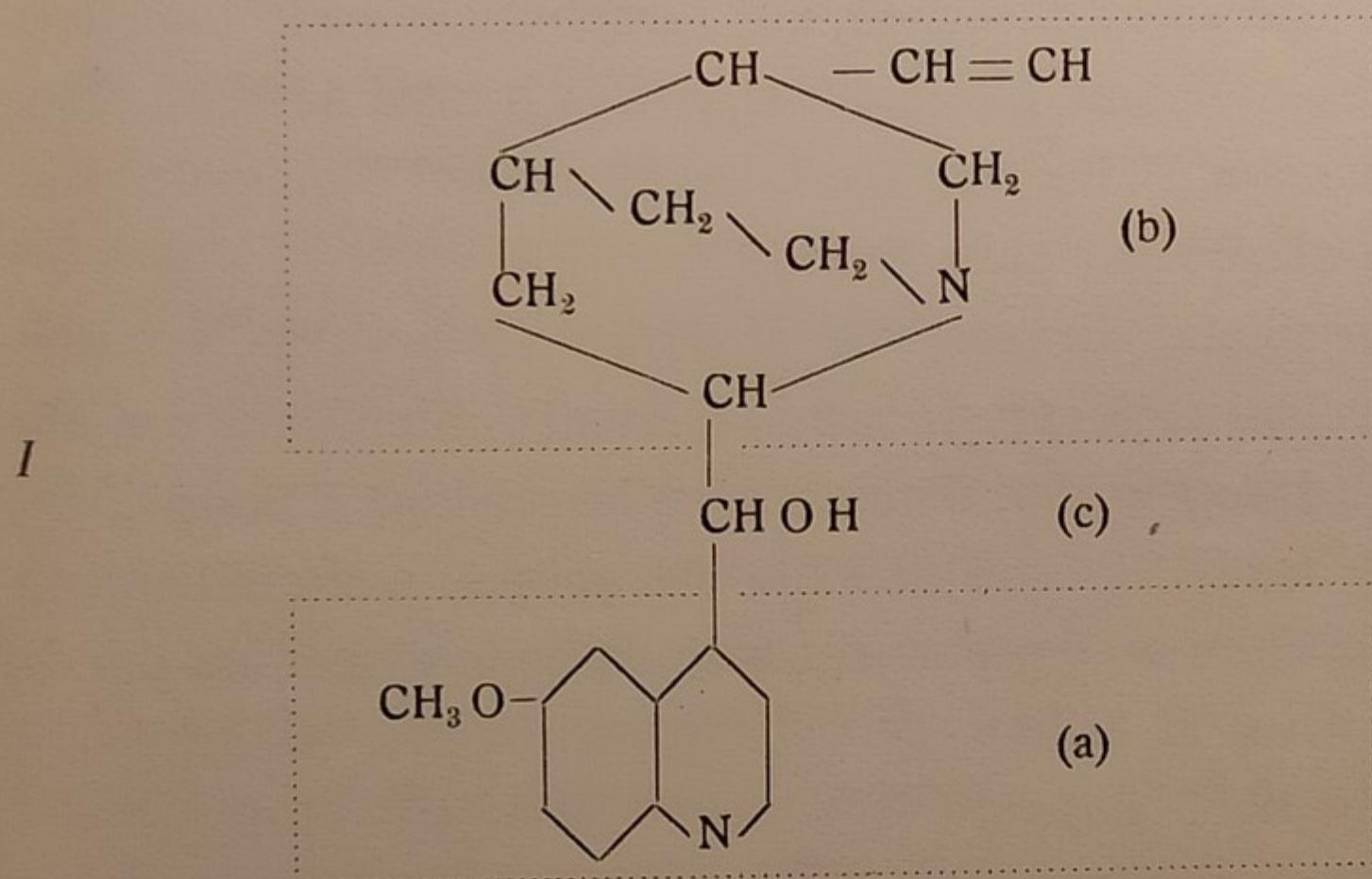
Dal Laboratorio farmaceutico scientifico della I. G. Farbenindustrie A. G.,
Werk Hoechst.

La scoperta degli antipiretici e analgesici pertinenti al gruppo del pirazolone è strettamente connessa d'un lato alla concezione che si aveva verso il 1880 dell'essenza della febbre e dei mezzi di combatterla, d'altro lato agli studi diretti a chiarire la costituzione della chinina, antimalarico specifico e antipiretico. Dopo che *Kolbe* nel 1874 ebbe insegnato ad ottenere dal sale sodico del fenolo contenuto nel catrame di carbone fossile e dall'acido carbonico una sostanza, che ha in comune colla sostanza originaria l'azione antisettica e antifermentativa, ma è atossica, questa sostanza - l'acido salicilico - fu sperimentata come antisettico interno nelle malattie infettive e in pari tempo se ne constatò l'azione antipiretica, che risultò sensibilmente uguale a quella della chinina; tuttavia ad onta del suo effetto favorevole nel reumatismo articolare acuto esso non poté soddisfare pienamente. L'effetto antiputrefattivo e antifermentativo, quello sugli organismi inferiori e quello antitermico che è comune a due sostanze costituzionalmente così diverse come sono la chinina e l'acido salicilico, venne ad appoggiare il concetto che la febbre fosse dovuta a microrganismi e che i detti farmaci la combattessero mediante distruzione dei microscopici esseri viventi.

In quell'epoca il problema della costituzione della chinina era al primo piano degli studi chimici. Un gran numero di chimici di vaglia si sforzava di determinare la costituzione di questo alcaloide complicato, scoperto da *Pelletier* e *Caventou*, che interessava i medici oltre che per l'effetto antipiretico anche e soprattutto per quello antimalarico. E appunto questa posizione

“doppia,, della chinina tra i medicamenti impose il problema se fosse possibile di ottenere mediante sintesi organica delle sostanze con tipo di azione uguale o simile. Ma per poter affrontare questo problema non erano ancora sufficienti le nozioni sulla parte che spetta nell'effetto ai gruppi costitutivi e agli elementi parziali della molecola della chinina. Per poterne venire a capo, la molecola doveva essere per così dire frantumata, i suoi pezzi parziali, studiati.

Ma ci vollero molti decenni di indagini intensive per chiarire completamente l'habitus costituzionale della chinina e per dargli quella espressione che oggi, mercè gli studi di *König*, *v. Miller*, *Skraup*, *Rhode*, *Rabe* e altri, vediamo nella formula seguente.



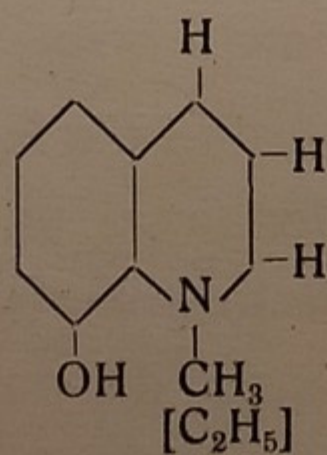
Come si vede, la molecola della chinina consta di due parti, il nucleo chinolinico che porta un gruppo ossimetilico (a), e un aggruppamento ciclico, ricco di idrogeno, il così detto componente loiponico (b); i due aggruppamenti sono riuniti da un atomo di carbonio di un alcool (c). Nell'epoca che corrisponde agli studi sulla sintesi di rimedi antipiretici, si sapeva relativamente poco della struttura chimica oggi ammessa della molecola della chinina. Si era potuta isolare dal complesso e studiare nelle sue proprietà una parte, la chinolina o ossimetilchinolina, tanto più che *Skraup* aveva insegnato a separare la chinolina e i

suoi derivati da ammine aromatiche. La constatazione che la chinolina ha proprietà antipiretiche, antizimotiche e antisetliche ebbe una grande portata, e incoraggiò vieppiù i chimici ad occuparsi nei loro studi di sintesi di questa sostanza, quale composto base per ottenere una sostanza coi caratteri della chinina.

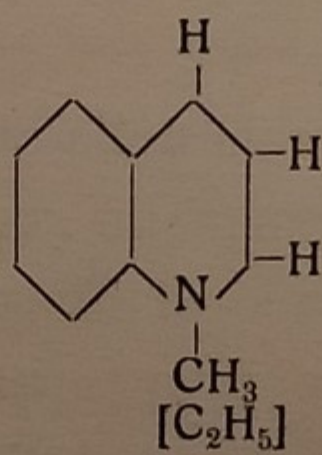
Per quanto questa concezione apparisse in seguito non del tutto esatta, pur tuttavia ha ancor oggi pieno valore per quanto riguarda l'azione antimalarica tipica. Invece risultò errata come base per ottenere antipiretici ed analgesici di valore. Ma questo errore doveva pur dare frutti nella sintesi di medicamenti.

Si riconobbe che il gruppo chinolinico è una parte importante della molecola della chinina. Però esso, efficace come antipiretico e come antisetico, ma terapeuticamente inutilizzabile, era presente come tale nella molecola intatta della chinina? Donde proveniva l'alto contenuto in idrogeno? Non poteva essere legato al gruppo chinolinico?

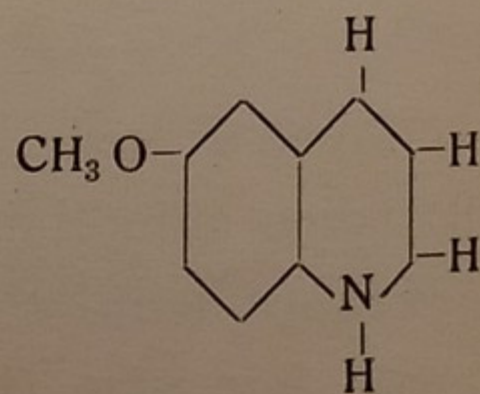
Questi problemi diressero le ricerche nei periodi immediatamente successivi. Si prepararono derivati chinolinici con alto contenuto in idrogeno: *O. Fischer* creò la cairina, *Königs* la cairolina e più tardi *Skraup*, in vista del gruppo ossimetilico contenuto nella chinina, gruppo che manca nella cinconina più debolmente attiva, la tallina.



Cairina



Cairolina



Tallina

Le prove farmacologiche e cliniche dei tre composti sembrarono confermare la concezione dei preparatori. Le tre sostanze avevano energica azione antipiretica, ma con controlli più precisi risultò che non erano affatto innocue; dati i loro peri-

colosi effetti accessori dovettero essere ben presto abbandonate. Ma pure scòmparendo ci avevano fornite importanti elementi di giudizio sui rapporti tra costituzione ed effetto. Così la introduzione nella molecola idrogenata di un gruppo OH comportò un effetto più rapido (cairina). Ma l'effetto era più transitorio, uno svantaggio che potè essere corretto chiudendo il gruppo OH con un gruppo metilico o etilico.

Anche la metilazione all'azoto (cairina, cairolina) risultò un artificio sintetico di grande importanza dal punto di vista farmacologico. Lo vedremo risorgere nelle sintesi nel gruppo pirazolonico, nel quale portò alla produzione di sostanze di valore curativo finora ignoto.

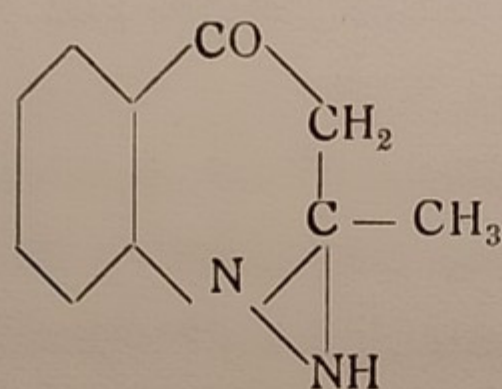
Frattanto gli studi per la determinazione della costituzione della chinina proseguirono senza tregua; essi furono considerati come uno dei compiti più importanti della chimica degli alcaloidi. Soltanto passo per passo la natura si lasciò strappare il suo segreto. Ma proprio i molti problemi insoluti nel campo della chimica diedero la stura alla fantasia dei chimici, che tenendo per guida la chinina passarono a nuove sintesi con concezione errata della sua struttura interna.

In quell'epoca la chimica organica fece progressi insperati tanto dal lato scientifico quanto da quello tecnico. Si navigava tra le sintesi. Già fino allora il campo precipuo di esse era la chimica delle sostanze coloranti artificiali, ma la nozione sempre più diffusa della loro importanza per la terapia non fece che accrescerne lo studio, tanto più che si era imparato a conoscere il valore per la medicina dell'etere, del cloroformio, del cloradio idrato ecc.

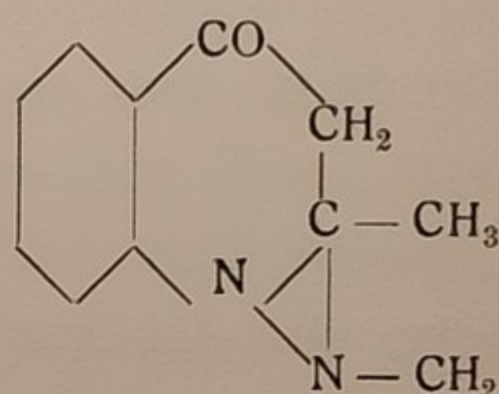
Emilio Fischer aveva dimostrato il largo campo di applicazione, in particolare per la chimica degli zuccheri, delle idrazine aromatiche. D'altra parte si era scoperto, mediante autocondensazione dell'etere acetico, l'etere acetacetico. *Knorr*, uno scolaro di *Emilio Fischer*, riunì le due sostanze, la fenilidrazina e l'etere acetacetico, e ottenne una sostanza chimicamente assai notevole.

Egli si immaginò lo svolgimento della reazione nel senso della formazione di una sostanza simile alla chinolina, per altro di un formato particolare. Anche in essa l'anello contenente N, condensato col nucleo benzolico, non poteva avere carattere aromatico non saturo, bensì ricordava, a parte l'appendice anulare a tre pezzi, lo stato idrogenato della molecola della cairina e della tallina.

Di nuovo dominarono qui i presunti rapporti costitutivi colla molecola della chinina, sicchè *Knorr* chiamò il suo prodotto metilossichinizina.



Metilossichinizina



Dimetilossichinizina

L'esame farmacologico del prodotto ottenuto da *Knorr*, esame fatto da *Filehne*, ha dimostrato che la via seguita non era priva di speranze, che il prodotto di condensazione esercitava indubbiamente effetto antipiretico. Ci si ricordava dell'effetto favorevole ottenuto nel gruppo cairinico mediante metilazione all'azoto. Anche la metilossichinizina portava un atomo di N, il cui idrogeno doveva essere sostituibile con un gruppo metilico. Il tentativo di metilazione riuscì e diede luogo a una sostanza con proprietà fisiche del tutto diverse. In contrapposto al prodotto privo di metile, la sostanza è una base spiccata e ottimamente solubile in acqua. Studi di orientamento ne dimostrarono la grande facoltà chimica di reazione e promettevano al chimico un proficuo campo di attività. Interessava in primo luogo una estesa analisi farmacologica, che *Filehne* si assunse del pari. Risultò ben presto che si trattava di una sostanza dotata di preziose facoltà farmacologiche; aveva azione antipiretica spiccata ed era relativamente poco tossica, sicchè si poté

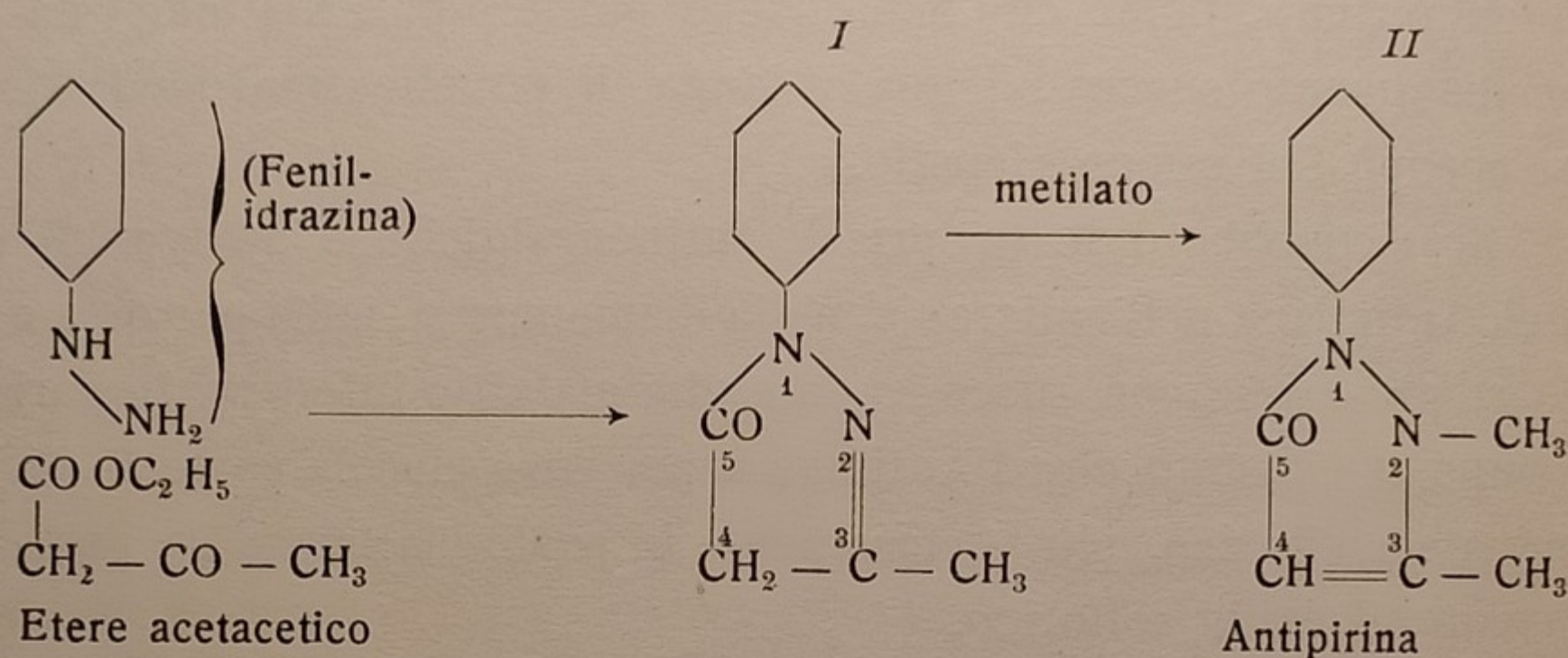
passare alle esperienze cliniche. Esse confermarono le risultanze farmacologiche: buon antipiretico senza i pericolosi effetti tossici dei rappresentanti del gruppo cairina. La tossicità era anzi molto moderata e di essa si poteva non tener conto, data la benefica influenza sulle varie forme di febbre. Allora *Knorr* affidò alle Farbwerken di Hoechst la produzione tecnica del suo procedimento e ben presto la dimetilossichinizina fece il suo ingresso nel mercato dei medicamenti col nome più semplice di « Antipirina », nome che non doveva perdere più. Nei tempi immediatamente successivi una valanga di pubblicazioni mediche si occupò del nuovo rimedio.

Si riconobbero le proprietà antineuralgiche e analgesiche dell'Antipirina nell'emicrania, nella dismenorrea, nella pertosse e la si prescrisse con successo in molte malattie infettive. In pari tempo si constatò che l'Antipirina per una piccola parte è eliminata coll'urina, più precisamente in parte inalterata, in parte legata ad acido solforico.

Non poteva non accadere che i nuovi palesi risultati favorevoli della sintesi di medicamenti non avessero una grande influenza sulle opinioni allora correnti sui rapporti tra costituzione ed effetti. Si era imparato a sostituire la chinina con un antipiretico ottenuto artificialmente, che anzi le era superiore come antinevralgico. Per altro a questo guadagno faceva contrapposto il fatto che la nuova sostanza non aveva alcun effetto sui plasmodî della malaria.

Ma proprio questa nozione fu istruttiva inquantochè le scoperte ulteriori di nuovi antipiretici e analgesici d'un lato, di antimalarici d'altro lato erano da attendersi da direttive diverse di ricerche. Si dovevano in primo tempo chiarire ancora alcuni punti riguardo alla stessa Antipirina. Il suo scopritore l'aveva ulteriormente studiata per anni. Le numerose reazioni che l'Antipirina presentava non apparivano più conformi alla formula della dimetilossichinizina e ben presto si comprese che la condensazione della fenilidrazina con l'etere acetacetico doveva svol-

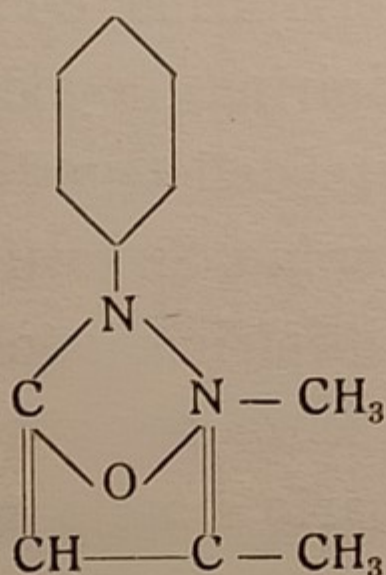
gersi in modo diverso da quello che si era originariamente ammesso. L'etere acetacetico non poteva applicarsi al nucleo benzolico della fenilidrazina, la condensazione e la formazione dell'anello dovevano essere diversamente interpretate. E *Knorr* trovò una nuova espressione chimica per il prodotto di condensazione e lo chiamò 1-fenil-3 dimetil-5 pirazolone (I), mentre chiamò l'Antipirina da esso risultante 1-fenil - 2,3-dimetil-5-pirazolone (II).



La nuova formula dell'Antipirina spiega la maggior parte delle estrinsecazioni chimiche di essa. In qualità di amide ciclica, fa intendere come in contrapposto alla sostanza di partenza, la fenilidrazina, che è un forte veleno del sangue, abbia perduto la tossicità di questa ultima. Tuttavia la sola struttura di amide non basta a spiegare una detossicazione di tale intensità, perchè ci sono altri derivati di struttura amidica della fenilidrina e della fenilmetilidrazina che sono ancora fortemente tossici. La struttura dell'anello, il nucleo pirazolonico, deve dunque avere avuto parte essenziale nella risultante. Prendendo in considerazione il simbolo chimico che vale ancora oggi, non si deve dimenticare che esso è soltanto espressione costituzionale di quanto è avvenuto, del prodotto sintetico, ma che da esso non si può dedurre il comportamento dell'Antipirina rispetto a certi addendi. Ciò è, secondo l'opinione di *Knorr*, soltanto possibile se ci si raffigura l'anello pirazolonico non come un

alcunchè di rigido, bensì si ammettono in esso delle valenze labili, similmente a quanto avviene nelle sostanze tautomere. *Knorr* giunse così a quattro formule di valenza chimica, che avrebbero dovuto rendere plausibile al chimico varii comportamenti dell'Antipirina, mentre *Michaelis* credette di avere trovato un'espressione più confacente alla situazione nella sua cosiddetta formula della betaina (III).

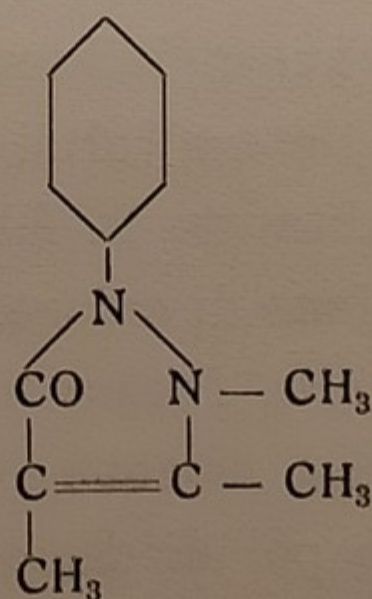
III



È difficile di farsi oggi un'idea della eco che ebbe tra i chimici e tra i medici la scoperta dell'Antipirina. I brillanti risultati della sintesi di medicamenti provocarono tra altro nuove discussioni sull'essenza dell'antipiresi. Già *Liebermeister* aveva riconosciuto la dannosa influenza che ha per se stessa l'aumentata temperatura, e con altri aveva dimostrato che la dispersione di calore è durante la febbre aumentata, ma che ancor più lo è la produzione di calore. Venne a concludere che la termoregolazione è nella febbre « fissata » a un grado più alto. Nel febbricitante essa sarebbe fissata a 40°, nel sano invece a 37°. *Filehne* cercò poi di dimostrare che l'effetto degli antipiretici si produce in questo modo, che essi « fissano ad un gradino più basso la termoregolazione », che pertanto viene abbassata l'altezza termica dell'equilibrio di stimolazione nel sistema nervoso centrale. Non è il caso di occuparci qui ulteriormente delle teorie sulla febbre, delle differenze tra chinina e antipiretici artificiali rispetto agli effetti sul ricambio e di altre questioni. Piuttosto si deve ricordare che gli antipiretici

ottenuti nei laboratori hanno indubbiamente influito sulle concezioni allora dominanti sulla febbre e sul modo di combatterla.

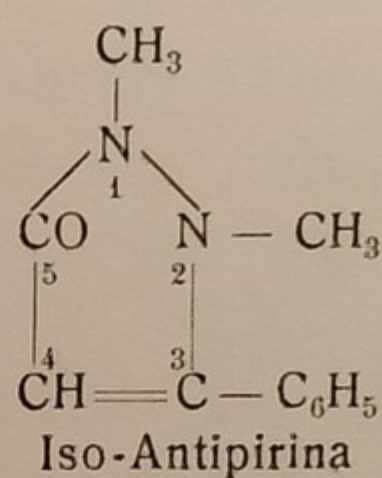
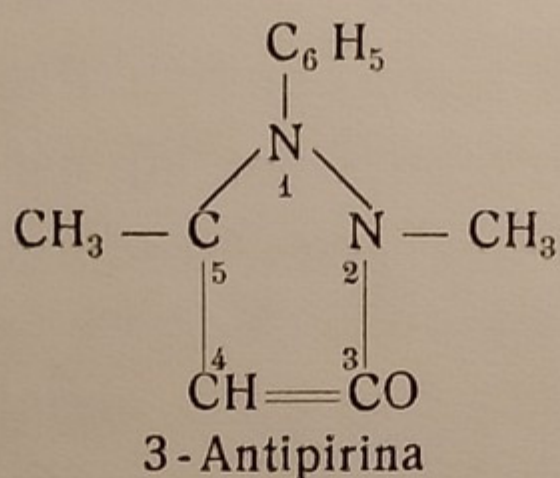
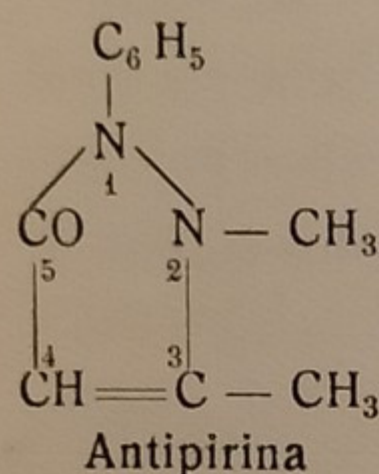
Appena fu riconosciuto il valore terapeutico dell'Antipirina, si cercò di migliorarne o modificarne l'effetto. Si prepararono gli omologhi dell'Antipirina, la omoantipirina e la tolipirina, che per altro non presentarono alcun vantaggio rispetto all'Antipirina. Videro così la luce il salicilato, l'acetil-salicilato e il canforato di Antipirina, la Micranina, che consta di Antipirina, caffeina e acido citrico, la Ferripirina, composto di ferro ad azione stitizzante, la cloral-antipirina, la jodopirina - per citare solo le più importanti - sostanze delle quali poche sono ancor oggi usate, ad esempio la Micranina. Si sostituì con zolfo (Tiopirina) l'atomo di ossigeno nell'Antipirina, oppure lo si sostituì col residuo anilico (Anilopirin), senza per altro eguagliare con questo prodotto il prodotto originario e tanto meno sorpassarlo. Furono preparati ed esaminati ben oltre mille composti della serie pirazolonica, strettamente connessi con l'Antipirina. Nella preparazione dell'Antipirina si produce come sostanza accessoria un feniltrimetilpirazolone; è la 4-metilantipirina.



4 - Metilantipirina

Ricerche approfondite furono fatte nelle Farbwerke di Hoechst per indagare le possibilità di applicazione di questa sostanza, che ha azione antipiretica un po' più spiccata dell'Antipirina, ma è anche più tossica e pertanto non potè essere presa in considerazione. Si tentò allora la trasformazione di questo prodotto accessorio in composti migliori. Si approfondirono così le nozioni

sulla chimica della serie pirazolonica, ma nulla di nuovo si ottenne da un punto di vista farmacologico. Un'altra possibilità di progresso risultò dalle seguenti considerazioni. Uno sguardo alla formula dell'Antipirina ci mostra che sono ideabili formule della stessa struttura molecolare, nelle quali i sostituenti attaccati all'anello pirazolonico sono ripartiti in modo diverso. Così ad es. i due isomeri 3-Antipirina e Iso-Antipirina sono ideabili così:



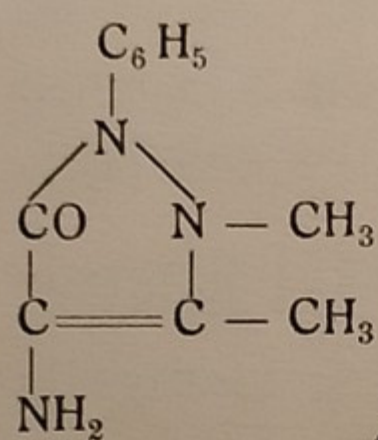
Entrambe le sostanze poterono essere ottenute per via sintetica. La 3-Antipirina risultò più tossica dell'Antipirina, mentre la Iso-Antipirina ha quasi la stessa tossicità dell'Antipirina, ma senza presentare vantaggi rispetto ad essa.

Sicchè per lungo tempo sembrò che nel campo della sintesi medicamentosa di sostanze antipiretiche e analgesiche si fosse raggiunto il culmine non sorpassabile e che gli effetti accessori dell'Antipirina fossero un quid inevitabile, al quale bisognava rassegnarsi in vista dei vantaggi del preparato.

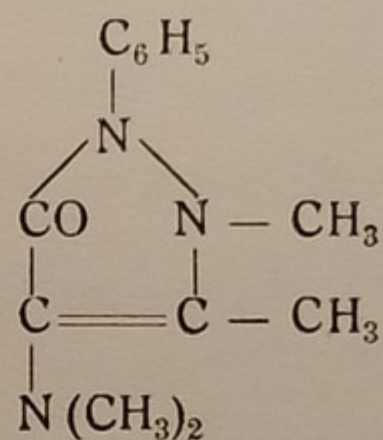
Erano ormai passati 10 anni dalla scoperta dell'Antipirina. Da lungo tempo si era osservato che essa dà con l'acido nitroso un composto nitroso di un bel colore verde, che è riducibile in un aminoderivato incolore, la 4-aminoantipirina.

Filehne, che per primo aveva riconosciuto l'effetto antipiretico della cairina e dell'Antipirina e, come abbiamo già ricordato, aveva portato importanti contributi al capitolo « Antipiresi », prese anche in seguito viva parte a tutti i lavori sintetici relativi e si mantenne in stretti rapporti con le Farbwerke di Hoechst, che da anni lavoravano in questo campo. *Knorr* aveva dimostrato che nella morfina, questo narcotico sovrano, si deve

ammettere un atomo di N terziario metilato. *Filehne* credette di poter ascrivere una grande importanza a questo gruppo; invero anche la cairina e l'Antipirina contengono un atomo di N così metilato. La introduzione di un altro gruppo terziario di N nell'Antipirina sembrò senza prospettive farmacologiche. E *Filehne* si rivolse a Hoechst con la preghiera di cercare di ottenere un'Antipirina con un radicale N (CH₃)₂ nel nucleo aromatico. Hoechst poté venire incontro al desiderio di *Filehne*, perchè già da qualche tempo poteva disporre di una sostanza simile, che era stata ottenuta per sintesi dal chimico *Federico Stolz*, ma non era ancora stata studiata farmacologicamente.



4-Aminoantipirina

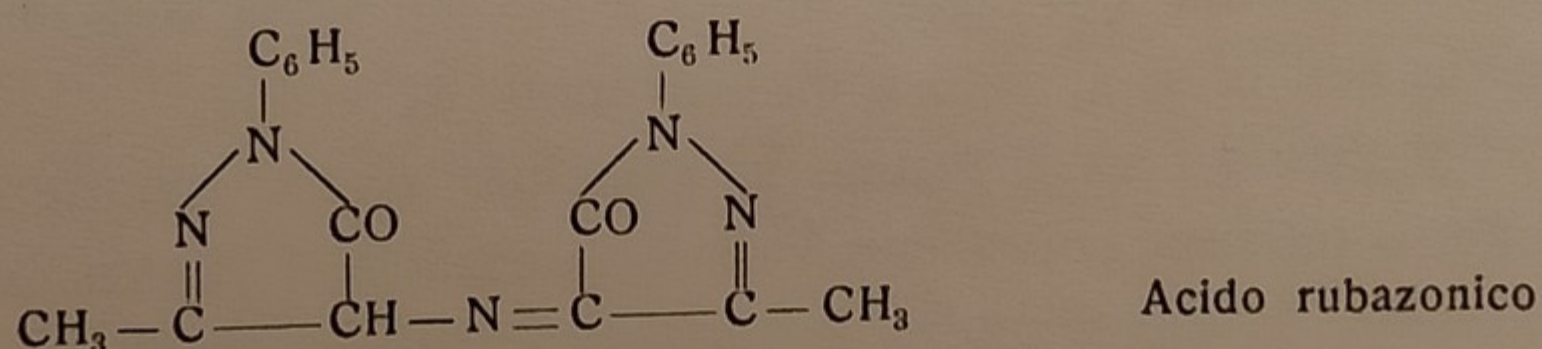


Piramidone

Veramente il radicale terziario N non si trova in questo composto nel nucleo aromatico, ma in posizione 4 dell'anello pirazolonico; tuttavia la sostanza isomera presentava, come si capisce, per il farmacologo lo stesso interesse di quella inizialmente desiderata. *Filehne* la studiò e riconobbe ben presto la superiorità del nuovo prodotto sull'Antipirina. Più precisamente gli effetti sono analoghi e il meccanismo antipiretico sembra essere lo stesso in entrambi i casi (modificazione della regolazione e raffreddamento più per aumento della dispersione termica che per diminuzione della produzione calorica), ma esistono differenze quantitative e qualitative essenziali. La nuova sostanza è negli animali a sangue caldo - uomo compreso - tre volte più attiva dell'Antipirina. L'effetto si insedia e si esaurisce più lentamente, è più blando e più facilmente graduabile. Il nuovo derivato del pirazolone fu poi offerto ai medici ed ebbe il nome di «Piramidone».

Ed allora iniziò l'enorme interessamento dei medici per

questo preparato. *Kobert*, basandosi su quasi 6000 casi, raccomandò - al Congresso della tubercolosi di Berlino - il Piramidone per combattere la febbre tubercolare e affermò che il cuore ne sarebbe piuttosto favorevolmente influenzato. Altri medici, che sperimentarono il rimedio nel tifo addominale, fecero rilevare che esso non soltanto abbassa la temperatura, ma agisce così favorevolmente anche sulle condizioni generali sul sensorio, sull'appetito e sul sonno, che il quadro generale del tifico diviene tutto diverso. Il nuovo rimedio andò acquistando sempre maggiore favore tra i medici e tra i pazienti. La sua benefica influenza su tutti gli stati febbrili, la sua azione calmante come antinevralgico e analgesico, le sue applicazioni in chirurgia, ginecologia e odontojatria sono così note ad ognuno, che non c'è bisogno di insistervi. Ricorderemo piuttosto soltanto gli incidenti storici. Nei primi tempi dell'uso del Piramidone fu gettato un grido d'allarme: dopo la somministrazione di Piramidone compariva nell'urina una sostanza colorante rossa, probabilmente ematoporfirina: dunque azione tossica sul sangue! Ma risultò ben presto che questa sostanza colorante altro non era che la sostanza già determinata da *Jaffé*, identica all'acido rubazonico ottenuto per sintesi da *Knorr* e riconosciuto, insieme all'antipirilurea, come prodotto di trasformazione del Piramidone nell'organismo.



Tra i sali del Piramidone, che ben presto si prepararono, interessano soprattutto il salicilato e il canforato, questo ultimo particolarmente utile perchè è in pari tempo antipiretico e antiidrotico nei tubercolosi.

Subito dopo la preparazione del Piramidone, avvenne la stessa cosa che dopo la scoperta dell'Antipirina. In base alle

concezioni riguardo ai rapporti tra costituzione ed effetto si andò alla ricerca di nuove sostanze del tipo del Piramidone. Videro la luce numerosi composti, ma la maggior parte di essi non corrispose, soltanto pochi erano buoni rappresentanti di questa classe, ma il Piramidone non fu sorpassato. Inoltre, se la introduzione nella molecola dell'Antipirina di un gruppo amminico terziario costituiva un passo così importante dal lato farmacodinamico, si poteva ben tentare di ripetere questo processo. Così vide la luce un Piramidone che aveva ancora nel nucleo aromatico il gruppo $N(CH_3)_2$, ma questo cambiamento comportò uno straordinario peggioramento dell'effetto.

Inoltre, come si era fatto per l'Antipirina, si prepararono isomeri del Piramidone, il 3 - Piramidone e l'iso-composto, nonché l'isomero originariamente desiderato da *Filehne* col gruppo $N(CH_3)_2$ nel nucleo benzolico, ma senza ottenere composti interessanti. Tutti questi sforzi portarono alla nozione che i risultati ottenuti permettono bensì di trarre qualche importante deduzione sui rapporti tra struttura chimica ed effetto fisiologico di una sostanza, ma che non è possibile di prevedere quantitativamente e qualitativamente l'effetto di una data sostanza; la fortuna e il caso non hanno piccola parte.

Si dovette quindi accontentarsi della constatazione che abbiamo nel Piramidone un antipiretico ideale, che non solo scuote la chinina dal suo regno, ma la rende del tutto superflua. Tuttavia non ci si arrestò a questo punto di arrivo.

Mentre gli studi furono in principio rivolti ad ottenere un effetto intenso, poi si cercò di differenziare l'effetto qualitativamente. Come si poteva intensificare l'azione analgesica che si ottiene col Piramidone? La soluzione di questo problema appariva molto difficile perchè non si disponeva di alcun metodo sicuro per studiare negli animali le malattie dolorose e il modo di influenzarle con rimedi. Questa difficile situazione sussiste ancor oggi. Soltanto gli studi più recenti nostri e dell'estero, cercano di colmare questa grossa lacuna nella metodica farma-

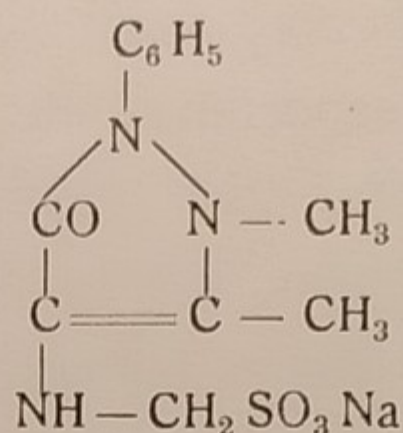
cologica. Al quesito, se una sostanza abbia effetto analgesico non si può attualmente rispondere che al letto del malato, sicchè nella preparazione di analgesici ci si deve basare esclusivamente su ipotesi e su esperienze. Se era esatta la concezione secondo la quale gli antipiretici vanno considerati come narcotici della febbre, si doveva, nell'intento di ottenere delle sostanze con rafforzamento del componente analgesico, cercare di combinare chimicamente due sostanze di determinato tipo d'azione; il nucleo dell'Antipirina ad azione antipiretica con un gruppo ipnotico, tale riconosciuto nei rimedi ad azione ipnotica e sedativa. Ciò era sperimentalmente possibile, perchè non soltanto l'aminoantipirina metilata contenuta nel Pyramidone, ma anche esso stesso esercita un forte effetto sui centri vasoregolatori. Così si poterono ad es. «appendere» i gruppi ipnofori al gruppo NH_2 dell'amino-antipirina. In base a questo principio, partendo dall'amino-antipirina si ottenne la N-valeril, la N-bromovaleril e la N-dietilbromoacetil-amino-antipirina. Ma questa ipotesi risultò errata, perchè l'esperienza dimostrò che un composto che deve essere considerato come una riunione chimica di due sostanze ad azione farmacologica diversa, non dà per effetto la somma dei due principi attivi, ma agisce più debolmente e spesso è anzi inattivo.

Per contro il principio della condensazione, così spesso usato in questa serie di ricerche, doveva dare con altre direttive un risultato completo. Prendendo le mosse dalla constatazione che il Pyramidone è relativamente di difficile solubilità e può essere somministrato soltanto per os, si cercò di ottenere una specie di Pyramidone solubile e iniettabile.

Ma tutti i tentativi di ottenere lo scopo introducendo nella molecola un gruppo che rendesse la sostanza solubile, fallirono.

Se ad es. si introduceva un gruppo acido acetico o acido sulfonico, l'effetto antipiretico-analgesico diminuiva. Tuttavia una eccezione fu trovata. Mediante condensazione di amino-antipirina

con bisolfito-formaldeide si produce una sostanza solubile in acqua della costituzione

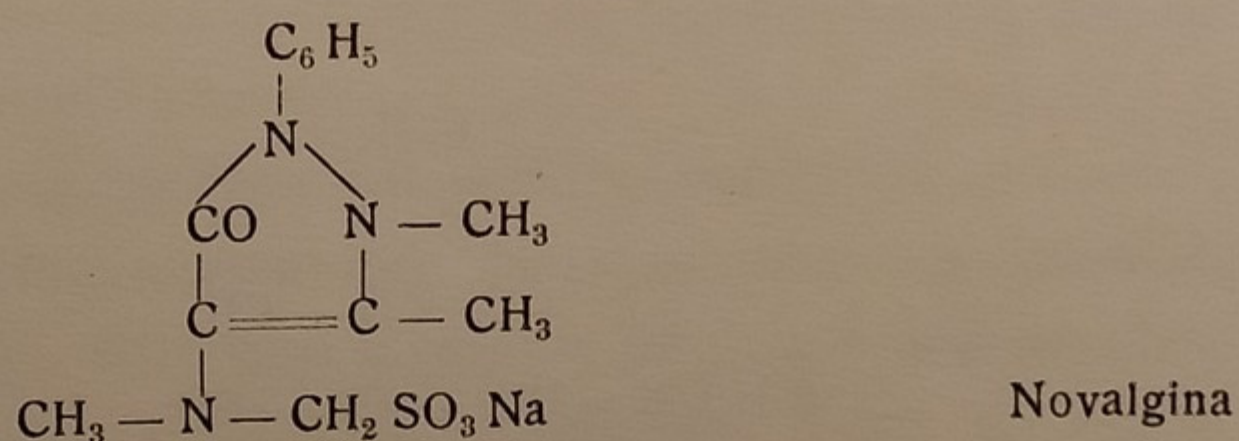


Melubrina

Le ricerche farmacologiche fatte con questo prodotto da *Straub* e *Biberfeld* dimostrarono che essa non ha un effetto antipiretico pari a quello del Piramidone. Ma il blando sfebbramento ed altre favorevoli proprietà fecero apparire consigliabile di chiedere al clinico il giudizio definitivo. *Löning* sperimentò dunque il preparato e ne constatò l'effetto specifico nel reumatismo articolare acuto. Data l'atossicità del preparato, poté somministrarlo a dosi alte; e in pari tempo stabilì che tra tutti gli antipiretici esso è il solo che agisce già alle dosi di gr. 0,50 e tuttavia è tollerato senza effetti accessori fino alla dose di 8-10 gr. Il preparato ebbe il nome di «Melubrina» e risultò ben presto assai vantaggioso, ad es. anche nelle nevralgie, nell'urticaria, nell'erisipela, nella tubercolosi e in altre malattie infettive. Anche la possibilità di introdurre la Melubrina per via parenterale, nella soluzione al 50%, è un vantaggio del quale si approfittò volentieri. Data la atossicità della Melubrina, nessuna controindicazione è per essa nota.

Naturalmente la fabbrica di Hoechst, che dal giorno della preparazione dell'Antipirina tenne il primato negli studi nel campo dei pirazoloni, cercò di perfezionare ulteriormente il progresso ottenuto con la Melubrina, tanto più che era risultato che nella ricerca di sostanze nuove si doveva badare piuttosto che alla intensità, alla qualità dell'effetto. Si prepararono gli omologhi superiori, un principio di sintesi che aveva trasformato in sostanze farmacologicamente attive i prodotti preliminari della cairina, dell'Antipirina e del Piramidone. Per

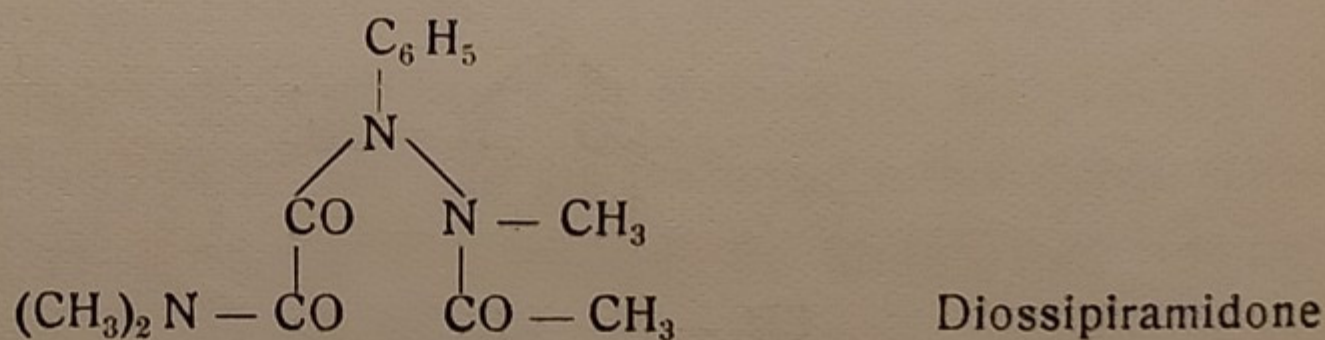
una variazione di tal genere venivano soprattutto in discussione nella molecola della Melubrina quattro posizioni; il nucleo benzolico, gli atomi di azoto che si trovano in posizione 2 e 4 e il radicale metilenico, che porta il gruppo sulfonico. Le due prime possibilità, che già prima erano state realizzate nell'Antipirina senza un risultato tangibile, non diedero nulla di nuovo neppure nella serie melubrinica. La introduzione di alchili nel gruppo metilenico non diede neppure derivati terapeuticamente più attivi. Restava l'alchilazione al 4 - N. Molti anni passarono dalla preparazione della Melubrina, prima che questo principio fosse praticamente applicato, dopo avere vinto talune difficoltà sperimentali. Studiati farmacologicamente varî rappresentanti di questo tipo, si scelse il derivato metilico per la prova clinica. Già i primi reperti di *Auer*, *Löning* e altri avevano dimostrato che il nuovo derivato della serie melubrinica, la N-metilmelubrina, è un antireumatico, un antipiretico e un analgesico molto attivo, essendo per qualità di azione uguale alla Melubrina e di intensità doppia della stessa. Ha inoltre il vantaggio di potere essere iniettato sottocute e intravene senza irritare i tessuti.



Le superiori proprietà qualitative del preparato - che fu introdotto col nome di «Novalgina» - andarono sempre più affermandosi. La Novalgina non soltanto fu riconosciuta un antipiretico di pronta azione nella polmonite, nella grippe, nel tifo e in genere in ogni malattia infettiva; si constatò che non ha alcuna azione nociva sul cuore, sul circolo e sui reni, e può essere prescritta senza preoccupazioni anche nelle gravi complicazioni cardiache e nelle nefriti acute e croniche; che gli sforzi già ricordati per differenziare l'effetto degli antipiretici segna-

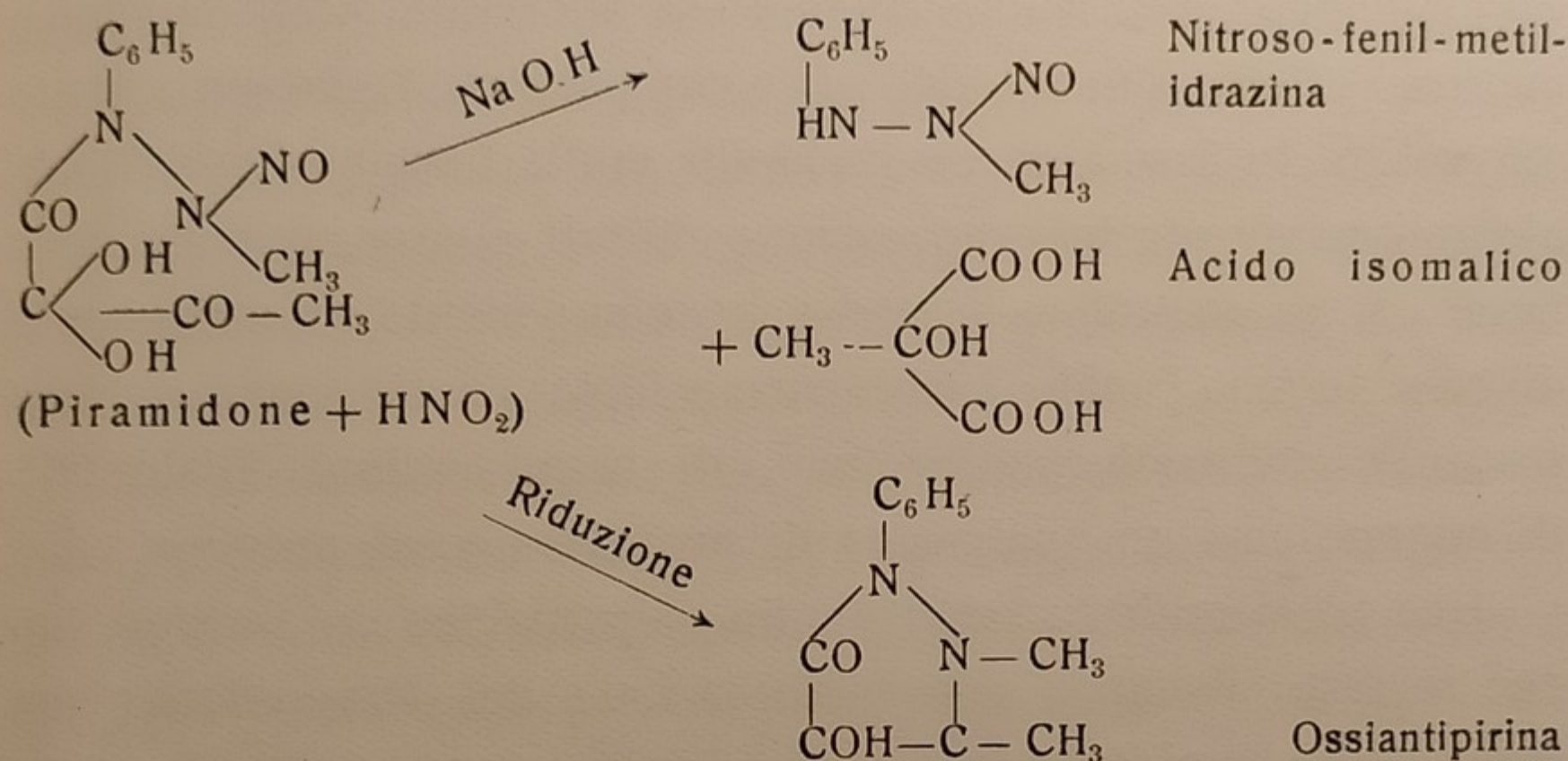
rono con la Novalgina una tappa reale, in quanto che si imparò sempre più a riconoscere in Clinica le sue proprietà analgesiche e antiflogistiche, ad es. nelle coliche renali e biliari, nei dolori postoperatori, nelle neuralgie, nelle artriti e in molte altre affezioni dolorose. In ogni campo il progresso conseguito colla Novalgina è indiscutibile; invero è attualmente possibile usando la Novalgina di far a meno in molti casi della morfina, l'analgesico per eccellenza. Persino per le cure di divezzamento dalla morfina e dall'oppio la Novalgina si presta bene, ma in questo campo non è ancora stata detta l'ultima parola.

Nel 1930 da autori francesi si riferì su un prodotto di ossidazione del piramidone, che fu denominato «diossipiramidone» e che si ottiene facendo agire sul piramidone il perossido di idrogeno. Il preparato avrebbe oltre alle favorevoli proprietà del Piramidone, un'azione ipnotica. A parte il fatto che la suddetta denominazione è errata, che la sostanza in parola non contiene l'anello pirazolonico, le affermate particolari proprietà del preparato non trovarono conferma. La reazione è interessante soltanto per il fatto, che col perossido di idrogeno viene aperto l'anello pirazolonico:



Su ciò ho richiamato l'attenzione già nel 1924 in una conferenza tenuta a Francoforte. Potei allora dimostrare che taluni ossidanti, come l'acido nitroso e il perossido d'idrogeno sono in grado di spezzare l'anello pirazolonico, che la reazione si compie in tutti i derivati dell'Antipirina che contengono in posizione 4 un residuo aminico sostituito. Ad es. il prodotto ottenuto con l'acido nitroso ha la formula più sotto riferita. Questa reazione è interessante anche in vista dei prodotti di trasformazione. Con l'idrato di sodio viene disgregata anche la se-

conda valenza con la quale la parte libera di N del nucleo pirazolonico originario aderisce ancora al residuo idrazinico. Si produce nitrosofenilmetilidrazina, mentre l'acido chetonico scissosi viene depositato in acido isomalico. Se per contro si tratta il prodotto di reazione su citato ottenuto dal Piramidone e da HNO_2 con sostanze riducenti, l'anello si richiude e si forma la 4-ossiantipirina già nota e ottenuta in altro modo da *Pschorr*:



Vediamo dunque qui per effetto di un particolare processo di apertura e di chiusura dell'anello, la trasformazione del Piramidone in ossiantipirina.

Abbiamo più sopra ricordato la errata concezione di trasformare in una sostanza nuova due sostanze medicamentose di gruppi farmacologici differenti mediante un processo di condensazione, con la speranza di ottenere presso a poco gli effetti dei due componenti. Ricordo ancora un'altra direttiva di rimedi ad azione analgesica, quella della riunione molecolare del Piramidone con un rappresentante delle sostanze ad azione ipnotica e sedativa, sempre allo scopo di ottenere una somma degli effetti o una nuova risultante di effetto. Questo principio non ha nulla a che vedere con quello antecedente ed è giustificato per il fatto che la legatura dei componenti parziali è una sola e connessa a valenze accessorie; di conseguenza è più lassa sicchè nell'organismo resta mantenuto il valore proprio di ogni com-

ponente, mentre in pari tempo sono esclusi effetti accessori. La prima sostanza di questo genere fu la «Trigemina» ottenuta dal Piramidone e dall'idrato di butilcloralio; essa è da anni apprezzata come analgesico e sedativo e per lungo tempo rimase il solo rappresentante di questa classe di sostanze. Soltanto molto più tardi si è combinato il Piramidone coi rappresentanti del gruppo del Veronale. In tutti questi tentativi si è cercato di ottenere un rafforzamento dell'azione analgesica spettante al Piramidone, mentre l'effetto ipnotico dell'altro componente viene più o meno affievolito. In base a questo modello, molti furono gli acidi barbiturici usati per la preparazione di tali composti doppi; soltanto col «Comprale» si scelse un componente essenzialmente diverso. In esso l'acido barbiturico a forte azione ipnotica viene sostituito dal triclوروetiluretano, di blanda azione (Voluntal). Si ottenne così un analgesico di proprietà assai pregiate.

Una via laterale fu battuta colla preparazione del Gardan. Anche in esso abbiamo una combinazione del Piramidone; ma come secondo componente non si scelse un ipnotico, bensì la Novalgina, di spiccata azione analgesica. Anche nel Gardan l'effetto dei singoli componenti è rafforzato; esso è un analgesico e un antiflogistico prezioso.

Se consideriamo nel loro complesso le tappe storiche della sintesi di medicamenti nel campo degli antipiretici e degli analgesici, vediamo che la spinta principale alle ricerche fu data dalla errata concezione della costituzione della chinina. Essa dette la prima direttiva di lavoro alla chimica sintetica. Soltanto la nozione sempre più precisa dei rapporti tra costituzione di un composto ed effetto chiarì lo scopo da raggiungere e indicò la via per raggiungerlo. Che se lo scopo originario di ottenere un rimedio antimalarico non fu raggiunto - un compito che doveva essere portato a soluzione soltanto più tardi, per altre vie - tuttavia dobbiamo a questo errore e al fatto d'averlo riconosciuto tutta una serie di nozioni preziose e di medicamenti di valore stabile.

Gli sviluppi della sintesi degli ipnotici

PROF. DR. H. WEESE

Dall'Istituto farmacologico della I. G. Farbenindustrie A. G.,
Elberfeld.

Benchè nessuna classe di medicamenti sia altrettanto ricca di preparati sintetici quanto quella degli ipnotici, pur tuttavia ognuno di questi prodotti ha trovato una cerchia più o meno estesa di partigiani. La ragione del gran numero di ipnotici sta nelle maggiori pretese che il terapista deve avere rispetto all'efficacia dei prodotti e nel fatto che gli ipnotici, oltrepassando il loro campo proprio, si sono spinti in tre direzioni: dei sedativi, dei narcotici e degli antiepilettici.

Benchè la forma dell'effetto di questi numerosi prodotti sia varia, il meccanismo dell'effetto è a tutti comune. Nessuna di queste sostanze entra in reazione chimica al luogo dove agisce con qualche sostanza delle cellule, perchè esse tutte sono dal punto di vista chimico relativamente indifferenti. Secondo la teoria di *Overton* e *Meyer* (1899), che vale ancora oggi, tutti questi composti agiscono soltanto per due proprietà fisiche, che trovano espressione nel coefficiente di suddivisione. Questo coefficiente indica il rapporto tra solubilità nei lipoidi e solubilità nell'acqua:

$$C = \frac{\text{Solubilità nei lipoidi}}{\text{Solubilità nell'acqua}}$$

Esso stabilisce dunque la ripartizione tra il sangue (acqua) e le cellule nervose particolarmente ricche di lipoidi. Ma poiché il contenuto delle cellule gangliari soltanto nelle singole parti del cervello varia non solo come quantità complessiva, ma anche come rapporto qualitativo dei singoli tipi di lipoidi, e varia soprattutto dei tipi solubili in acqua, si intende che ogni sostanza si diffonde nelle singole parti cerebrali corrispondentemente al loro proprio coefficiente di ripartizione. Ma inoltre la struttura chimica o fisico-chimica dei singoli gruppi di cel-

lule nervose cambia non soltanto da uomo ad uomo, ma anche nello stesso individuo si hanno oscillazioni secondo il variabile stato funzionale (tono) delle cellule nervose. Ciò spiega la grande varietà di effetti degli ipnotici, nonché il differente modo di reagire di vari pazienti allo stesso rimedio. Se una cellula nervosa si è, corrispondentemente al suo coefficiente di ripartizione, arricchita di un ipnotico, si svolge sempre lo stesso processo. L'ipnotico si deposita nella superficie di confine e ne diminuisce la permeabilità; con ciò frena il ricambio e secondariamente la funzione specifica. Si produce quello stato reversibile di diminuita funzione, che chiamiamo sonno o narcosi.

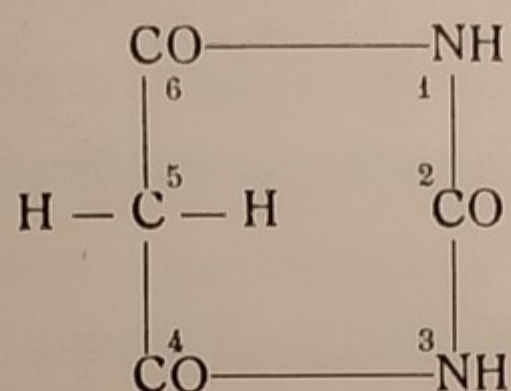
Tuttavia il coefficiente di ripartizione ha influenza soltanto sulla qualità dell'effetto terapeutico. La quantità dell'effetto viene determinata - a parte la dose volontariamente scelta - dalla rapidità dei processi di scissione e di eliminazione della sostanza. Siccome siamo in grado di determinare, entro dati limiti, mediante il tipo e la forma dell'applicazione, l'inizio dell'effetto, sorge come secondo problema quello della scissione del preparato che determina la fine dell'effetto. La distinzione, assai importante agli scopi pratici, tra rimedi addormentanti e ipnotici di azione protratta, doveva di conseguenza essere considerata come un problema di ricambio.

Facciamo dunque a buon diritto distinzione tra rimedi addormentanti, che vengono richiesti da determinati gruppi di pazienti, e ipnotici di azione protratta (durata del sonno superiore a quella del sonno normale). Un posto intermedio si può dare ai così detti rimedi provocanti un sonno medio (durata del sonno, corrispondentemente a quella normale, 6-8 ore).

Si deve escludere da un punto di vista farmacologico una differenziazione in ipnotici leggeri e forti, perchè l'intensità dell'effetto nell'uomo dipende dalla dose deliberatamente scelta. Anche nella sintesi degli ipnotici è risultato che spesso delle piccole modificazioni della molecola hanno per conseguenza grandi differenze terapeutiche. Accennerò brevemente allo sviluppo di

tale gruppo di rimedi sulla base di alcuni esempi dimostrativi di derivati dell'acido barbiturico.

Il punto di partenza di molte centinaia di derivati, quale è l'acido barbiturico (malonilurea),



non ha per se stesso azione ipnotica. Anche con la sostituzione di un atomo di idrogeno all'atomo C(5), non si produce ancora una sostanza ad azione ipnotica. Soltanto se i due atomi di H, situati in posizione 5, vengono sostituiti con due radicali alchilici (almeno con gruppi etilici) hanno origine sostanze con proprietà ipnotiche.

Il primo composto di questo genere fu l'acido dietilbarbiturico, il Veronale (*Fischer e Mehring*, 1903). Il Veronale è il rappresentante caratteristico degli ipnotici di efficacia protratta. Siccome è difficilmente solubile in acqua, viene assorbito soltanto lentamente dal canale digerente. La dose ipnotica abituale di gr. 0,50 agisce pertanto, quando sia somministrata per os, soltanto dopo 1-2 ore. Il sonno si mantiene a lungo, d'un lato perchè il Veronale continua a essere assorbito per ore, d'altra parte perchè la molecola è assai resistente; soltanto una piccola parte viene scissa nel ricambio intermedio. Il 70-90 % (*Fischer e Hoppe, Halberkann e Reiche*) della dose terapeutica viene eliminato inalterato con le urine, nel corso di giorni. Non è noto un prodotto di scissione del Veronale, che si formi nel ricambio intermedio. Benchè il Veronale, come tutti gli acidi barbiturici, debba essere considerato un rimedio del peduncolo cerebrale, esso ha influenza relativamente scarsa sui centri di importanza vitale del midollo allungato, sul centro respiratorio e vasomotorio; di conseguenza anche gli effetti accessori che si

osservano in Clinica sono relativamente poco importanti. E' caratteristico del Veronale il fatto, che la sua azione si protrae molto a lungo, tanto che somministrandolo per parecchi giorni di seguito esiste il pericolo dell'effetto cumulativo. Tuttavia, quando l'indicazione sia ben scelta, ossia quando si tratti di pazienti nei quali è desiderabile dopo un sonno prolungato un effetto sedativo successivo, questa particolarità del Veronale è di vantaggio.

E' caratteristico del Veronale l'atomo di $C(5)$, sostituito da due radicali alchilici dello stesso tipo.

Con l'acido feniletilbarbiturico, il Luminale (*Impens*, 1912), si ottenne una sostanza con due sostituenti differenti, un radicale alchilico e un radicale arilico. Anche il Luminale fa parte degli ipnotici ad azione protratta. Nell'uomo e nell'animale sani, esso non si differenzia qualitativamente gran che dal Veronale come effetto ipnotico. Diversamente procedono invece le cose quando si tratta di un sistema nervoso alterato: *Hauptmann* (1912) ha scoperto che il Luminale esercita azione antiepilettica. Una parte notevolmente grande di Luminale viene scissa nell'organismo; infatti *Halberkann* e *Reiche* poterono trovare nell'urina soltanto l'11-25 % di Luminale inalterato. Non è finora noto un prodotto intermedio di scissione del Luminale.

Basandosi sulle esperienze fatte col Luminale come ipnotico, nei nostri Laboratori di Elberfeld venne praticata la idrogenazione totale e parziale dell'anello fenilico. Ebbe origine così l'acido cicloeseniletilbarbiturico, il Panodorm (*Impens*, 1925). Il Panodorm è un ipnotico puro senza effetto antiepilettico. La farmacologia di esso presenta un dato nuovo. Già un quarto d'ora dopo la somministrazione di una dose ipnotica (per os), gli animali (cani, gatti) dormono profondamente. Si risvegliano dopo 6-8 ore e al mattino seguente sono di nuovo perfettamente svegli e vivaci. Anche con dosi narcotizzanti massime gli animali si rimettono in modo relativamente rapido e senza esiti. Già queste esperienze sugli animali facevano presumere che il Panodorm

fosse una sostanza che sta farmacologicamente tra i rimedi ad-
dormentanti e quelli che provocano un sonno prolungato: un
ipnotico cioè che dà un sonno medio. Un'estesa esperienza cli-
nica ha confermato queste supposizioni. Il Panodorm provoca
nell'uomo dopo $1/2$ - 1 ora un sonno della durata di 6 - 8 ore,
dal quale il paziente si risveglia al mattino ristorato. Ricerche
comparative tra l'acido cicloeseniletilbarbiturico e il suo sale di
calcio hanno dimostrato che col sale l'inizio dell'effetto del Pa-
nodorm viene accelerato di circa $1/3$.

Fretwurst e *Halberkann* hanno fatto studi approfonditi sulla
eliminazione del Panodorm e trovarono che dopo dosi alte di
Panodorm date in breve tempo soltanto il 2,5 - 6,3 % della so-
stanza inalterata viene eliminato con le urine. Inoltre *Halberkann*
potè dimostrare nell'orina un prodotto di trasformazione nella
proporzione del 12 - 19 %.

Questo prodotto di trasformazione (acido etilcicloesenonilbar-
biturico?) non ha però più azione narcotica, nè si addimosta
tossico anche ad alte dosi. E' sperabile che con la determi-
nazione della costituzione di questo prodotto di trasformazione
si possa farsi un'idea della scissione fisiologica di questo e di
altri derivati simili dell'acido barbiturico. Circa l'80 % del
Panodorm deve essere scisso nel ricambio organico in prodotti
che finora non poterono essere trovati. Questa rapida e intensa
scissione del Panodorm spiega molto bene la suddetta brevità
dell'effetto, la mancanza di effetti postumi e la bassissima tossicità.

Con ulteriori sostituzioni al C_5 si trovarono altre centi-
naia di ipnotici, buon numero dei quali si è affermato in te-
rapia. *Dox* (1923) cercò di riassumere nella regola seguente le
constatazioni fatte con la sostituzione al C_5 . Al C_5 devono
essere alchilate entrambe le valenze. Ambedue gli alchili devono
contenere complessivamente almeno 4, al massimo 8 atomi di C.
Almeno un alchile deve essere in catena aperta. L'aumento del
peso molecolare a oltre 250 comporta una perdita di effetto
ipnotico.

Tra il numero stragrande di questi prodotti di sostituzione non si trovò più neppure un antiepilettico, fino a quando, prendendo le mosse dal Luminale, e alchilizzando il suo N_1 , io ottenni un antiepilettico, che in molti casi si dimostra superiore al Luminale: l'acido C-C-feniletil-N-metilbarbiturico, ora denominato Prominal (*Weese*, 1931), ha nei gatti azione esclusivamente narcotica come il Luminale; la durata dell'effetto è però doppia. Ciò non ostante la tossicità di esso è di $\frac{1}{3}$ minore di quella del Luminale. Siccome il Prominal si differenzia dal Luminale nell'animale sano soltanto per la durata dell'effetto, abbiamo cercato di ottenere negli esperimenti sugli animali uno stato equivalente alle convulsioni epilettiche. Si possono bensì provocare convulsioni epilettiformi con mezzi chimici e fisici, ma queste convulsioni si possono eliminare non solo col Prominal e col Luminale, ma anche col Veronale, sicchè si dovette ammettere che l'effetto ottenuto era dovuto all'azione narcotica, ossia era aspecifico. La prova dell'efficacia antiepilettica specifica non può essere fatta ancor oggi che dal Clinico sugli epilettici. Questa prova venne a confermare il nostro concetto che il Prominal è un antiepilettico; non solo, poichè da essa risultò che mercè la particolare ripartizione del Prominal nel sistema nervoso centrale dell'epilettico la distanza tra effetto ipnotico ed effetto antiepilettico è maggiore che nel Luminale. Il Prominal ha dunque una maggiore specificità. L'abbattimento e la sonnolenza che si osservano talvolta negli epilettici curati con Luminale non si hanno a lamentare col Prominal.

Le nostre ricerche sistematiche sugli acidi barbiturici alchilati all' N portarono inoltre alla produzione di una serie di ipnotici più o meno rispondenti. Tra essi si affermò una sostanza che sembrò adatta a colmare una lacuna assai sentita. E' questo l'acido C-C-cicloesenil-metil-N-metilbarbiturico, l'«Evipan» (*Weese*, 1932). Negli esperimenti sugli animali questi dormirono con rapidità doppia che col Panodorm; i canarini ad es. già dopo 2-3 minuti. Se si somministrava in soluzione diluita il

sale facilmente solubile nei lipoidi, la rapidità dell'effetto diveniva anche maggiore. Con la iniezione intravenosa gli animali cadono durante l'iniezione stessa, entro qualche secondo, in sonno o in narcosi. Corrispondentemente a questa grande rapidità di effetto, la durata dello stesso è brevissima. Gli uccelli (*Hondelink*) si svegliano dal sonno dopo 30 minuti, i topi dopo 50 - 60. I gatti si svegliano dalla narcosi ottenuta per via intravenosa dopo 3 - 50 minuti, secondo la dose. Questi dati caratterizzano uno dei lati notevoli dell'Evipan e dell'Evipan sodico. L'altro lato caratteristico del preparato è la minima tossicità. Essa risulta nel modo migliore con le iniezioni intravenose; nel gatto già 20 - 25 mgr. pro Kg. di peso provocano una narcosi della durata di pochi minuti. Gli stessi animali sopravvivono però a 100, persino a 110 mgr. di Evipan sodico.

Da ciò risulta un'ampiezza terapeutica superiore a quattro. Questa insolita atossicità sta a documentare che l'Evipan è un ipnotico genuino, perchè d'un lato esso provoca assai rapidamente analgesia e perdita dei riflessi, d'altro lato invece narcotizza soltanto tardivamente il centro vasomotorio. La morte avviene sempre in paralisi respiratoria. L'Evipan sodico per via intravenosa dovrebbe rappresentare un narcotico parimenti prezioso per il medico e per il malato, come preparazione alla narcosi e come narcotico base per le narcosi brevi, di 15 - 20 minuti. Per os l'Evipan sembra essere l'addormentante tipico per pazienti che alla sera hanno difficoltà ad addormentarsi, oppure svegliandosi nel corso della notte non riescono più ad addormentarsi. Anche per l'Evipan la brevità del suo effetto va spiegata con la rapida scissione di esso nell'organismo. Nell'urina di animali narcotizzati poté essere dimostrato soltanto il 2,3 - 2,8 % di un derivato dell'acido barbiturico, non più esattamente determinabile. Notevole che dei gatti, che con la iniezione giornaliera di un acido barbiturico molto affine furono abituati per mesi a questa sostanza, reagirono in modo pienamente normale ad iniezioni intercalate di Evipan. La scissione

intermedia dell'Evipan e anche del Prominal deve dunque seguire vie diverse da quella degli acidi barbiturici, che non sono sostituiti all'azoto.

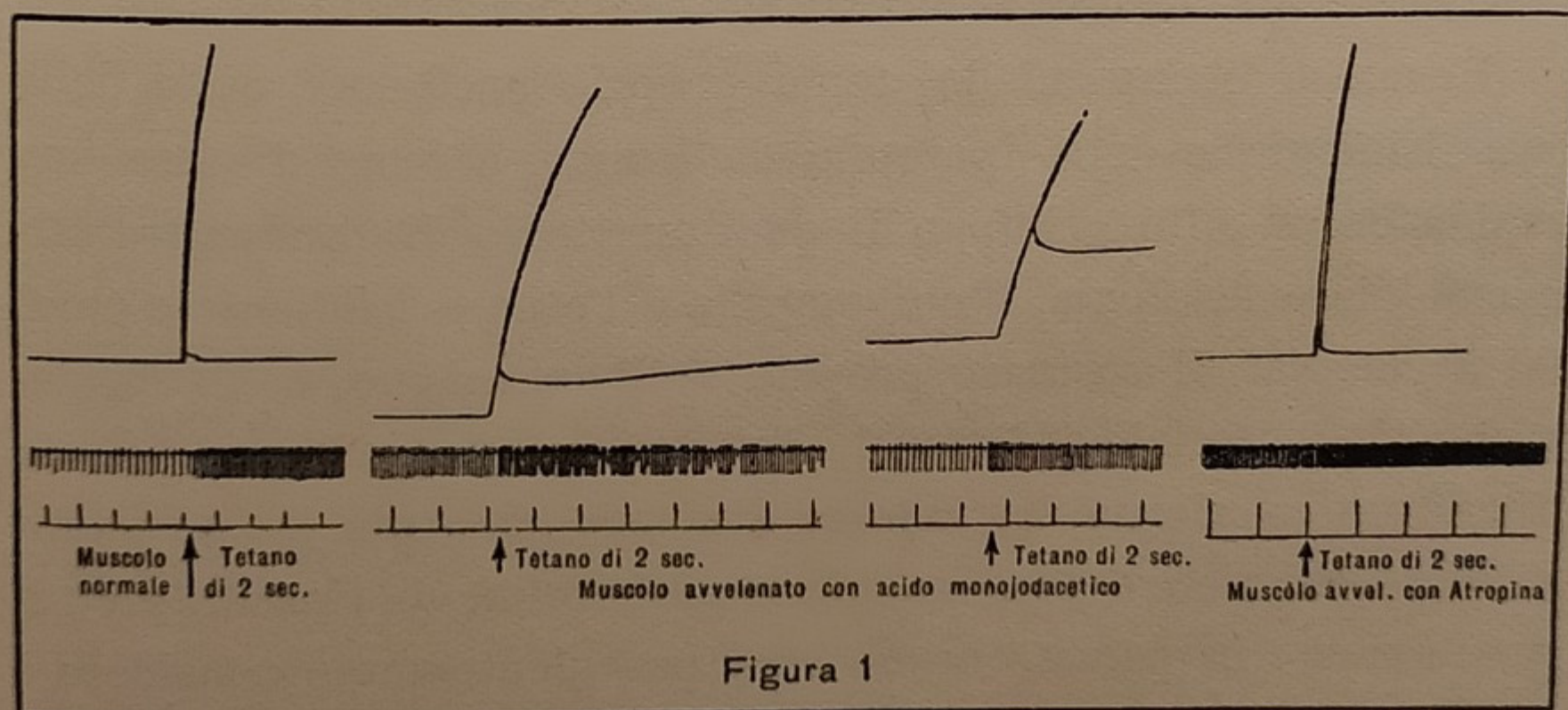
Tornando un passo indietro, si deve far rilevare che i due problemi fondamentali della farmacologia degli ipnotici e dei narcotici sono la loro ripartizione nel sistema nervoso centrale e il loro ricambio intermedio. Volenti o nolenti, si dovette prendere in considerazione il primo problema seguendo la via retrograda ossia dalle conseguenze (modo di azione) alla causa (coefficiente di ripartizione), perchè per difficoltà tecniche siamo ancora in condizioni non soddisfacenti riguardo alla determinazione della solubilità degli acidi barbiturici. Un po' più avanti siamo rispetto al quesito della scissione degli acidi barbiturici perchè si è potuto almeno determinare la quantità della sostanza eliminata inalterata con l'urina e per alcuni derivati non saturi degli acidi barbiturici anche i loro primi prodotti di scissione.

Fondamenti chimico - fisiologici della iperemia da lavoro

DR. R. RIGLER

Dall' Istituto di Farmacologia della I. G. Farbenindustrie A. G.,
Werk Hoechst.

Gli organi in lavoro, specialmente i muscoli striati, richiedono una maggiore irrorazione sanguigna. Per dare un'idea approssimativa della entità delle modificazioni del letto circolatorio durante il lavoro muscolare, ricordiamo le ricerche di *Krogh*, che nel muscolo in riposo osservò al massimo per ogni mm.² della sezione trasversa 270 capillari aperti, mentre uguali restando le altre condizioni vide nel muscolo in lavoro 2500 capillari in funzione circolatoria. Questo aumento di irrorazione può essere anche constatato - come si potè dimostrare nel nostro Laboratorio - in determinate condizioni col preparato vasale di rana di *Laewen-Trendelenburg*, mettendo in attività la muscolatura con stimolazione elettrica indiretta.



La figura I dimostra la profonda e durevole influenza che un tetano della durata di due secondi esercita sulla irrorazione. E' senz'altro chiaro che con un tale meccanismo si corrisponde sufficientemente al maggiore fabbisogno di ossigeno del muscolo

in lavoro, ed è ovvio di vedere nella maggiore capillarizzazione la prima espressione di una iniziale insufficienza di ossigeno.

Si è parlato dell'effetto di prodotti acidi del ricambio, riferendosi a ricerche dalle quali risulta la grande sensibilità dei vasi di fronte a modificazioni della concentrazione degli idrogenioni. A questo riguardo è degno di nota, che il fondatore della capillaroscopia, *Krogh*, pure essendo allora solo a sostenere questo concetto, già nel 1923 affermava essere possibilissimo, anzi probabile, che dei prodotti del ricambio che si formano durante l'attività esercitino azione dilatatrice sui capillari e sulle arterie; riteneva però altrettanto inverosimile che una tale azione dipenda dall'acidità di detti prodotti. Il più recente sviluppo della fisiologia muscolare ha frattanto reso inutile di ricorrere a una ipotesi acida per spiegare la maggiore irrorazione durante il lavoro.

Meyerhof e *Lippmann*, confermando una idea già espressa antecedentemente da *Embden*, trovarono che il muscolo in lavoro diviene dapprima alcalino e soltanto in uno stadio avanzato della stanchezza, acido. L'aumento della irrorazione si compie invece già all'inizio dell'attività del muscolo.

Prima di occuparci del tema proprio prefissoci, ossia delle basi fisiologiche della iperemia da lavoro, è bene di fare una rapida corsa sullo sviluppo di quel territorio di confine tra farmacologia e fisiologia, il cui oggetto è l'esame mediante metodi farmacologici di sostanze proprie dell'organismo, ossia fisiologiche. Un materiale di fatto, che è andato sempre più aumentando di giorno in giorno, ha indotto a considerare più da un punto di vista chimico e con maggiore probabilità di riuscita alcuni processi che in passato erano stati prevalentemente considerati come espressioni di un alcun che di fisico, ancora ignoto nelle sue particolarità. Da lungo tempo era apparso chiaro che l'organismo, per compiere una lunga serie di funzioni, ha bisogno della collaborazione di sostanze chimiche esattamente definite, per le quali, senza pregiudizio di migliore definizione, si può

usare quella di ormoni. Ma tali reazioni ormonali sembrarono essere caratterizzate da uno svolgimento relativamente lento. Invece le nuove concezioni fissate da *Otto Löwi* rendono possibile di ammettere uno svolgimento straordinariamente rapido di tali reazioni chimiche intercalate, ossia della formazione e della distruzione di sostanze ormoniche, o detto forse meglio, di sostanze umorali, come ad es. la sostanza vagale. Ciò comporta per conseguenza di prendere in considerazione anche per la vasodilatazione durante il lavoro muscolare la possibilità della neoformazione o della messa in libertà di ammine biogene. *Freund* e *Gottlieb* parlano di sostanze istammino-simili. *Macleod* ritiene possibile che sia l'istamina o una sostanza simile quella che causa la vasodilatazione durante il lavoro muscolare. *Feldberg* e *Schilf* riferiscono di ricerche di *Schulte*, che trovò che il contenuto del muscolo gastrocnemio del gatto in riposo in sostanze contraenti l'intestino è più di tre volte maggiore che nel muscolo stimolato. Inoltre *Hess* ha osservato che il liquido irrorante che esce da un preparato di muscolo di rana provoca nell'intestino isolato di cavia e di ratto effetto di stimolazione del tipo di quello dell'acetilcolina, effetto che aumenta assai dopo tetanizzazione del muscolo.

L'azione vasodilatatrice dell'acetilcolina e dell'istamina è sufficientemente nota; ma non è affatto certa la compartecipazione di esse alla produzione dell'iperemia da lavoro. Appare ad es. altamente inverosimile una regolazione autoctona dell'ampiezza dei vasi coronarî per opera dell'acetilcolina, e ciò in considerazione della particolare azione di questa sostanza sul ritmo e sullo svolgimento della contrazione. D'altra parte la irrorazione delle coronarie non è affatto regolarmente aumentata dalla istamina; essa aumenta o diminuisce secondo la specie dell'animale. Ma una sostanza che causasse iperemia da lavoro dovrebbe produrre anche qui regolarmente dilatazione, senza con ciò influire in senso depressivo sull'attività del cuore. E' risultato che un gruppo di sostanze finora ignote rispetto alla loro efficacia sul

circolo è in grado di rispondere completamente a queste condizioni. Si tratta dei nucleotidi presenti nei muscoli dello scheletro e nel miocardio. Sono essi l'acido adenosinmonofosforico (acido adenilico) e l'acido adenosintrifosforico (acido adenilpirofosforico). A questo gruppo appartiene inoltre il neucloside adenosina, che si produce dalle suddette sostanze per separazione dell'acido fosforico e che è ancora più attivo rispetto all'influenza sul circolo. La presenza dell'acido adenilico nei muscoli dello scheletro è stata riconosciuta da *Embden* e *Zimmermann*, quella dell'acido adenilpirofosforico da *Fiske* e *Subbarow*, l'efficacia sul circolo di tutte tre le sostanze, per la prima volta da *Drury* e *Szent-Györgyi*; ad essi va ascritto secondo *Zipf* e collaboratori l'effetto vasomotorio dei così detti «veleni rapidi del sangue» (*Freund*). Questa categoria presenterebbe una importanza particolare perchè dalle ricerche di *Drury* e *Szent-Györgyi*, *Rigler* e *Schaumann*, *Wedd*, *Lindner* e *Rigler*, *Bennet* e *Drury* è risultata la loro azione vasodilatatrice elettiva sui vasi coronari. L'adenosina esercita spiccata azione dilatatrice sulle coronarie, col metodo di *Langendorff*, già alla diluizione di 1:5 milioni. Ricerche fatte in questo nostro Laboratorio hanno poi dimostrato che l'azione vasodilatatrice sulle coronarie esercitata dell'adenosina, dall'acido adenilico e da quello adenosintrifosforico è constatabile non soltanto negli animali abituali da esperimento, ma anche nei cuori di uccelli e di rettili.

L'azione vasodilatatrice dell'adenosina, dell'acido adenilico (acido adenosinmonofosforico) e dell'acido adenosin-trifosforico (acido adenil-pirofosforico) è stata dimostrata sperimentalmente sui vasi coronari dei seguenti animali:

Capra, Maiale, Cane, Gatto, Coniglio, Cavia, Porcospino, Ratto, Gallo, Tartaruga.

Viene spontanea la domanda se, data questa azione generale delle dette sostanze, esse e in particolare l'acido adenosintrifosforico non partecipino fisiologicamente alla iperemia da lavoro. In primo luogo si ricercò se al cuore esista, analogamente alla iperemia da lavoro dei muscoli dello scheletro, un rapporto tra ampiezza di stimolo e circolo coronario, ossia una influenza chimica autoctona sull'ampiezza dei vasi coronari, la quale si

espliciti con la influenza della frequenza del ritmo sulla ampiezza di irrorazione. Il fatto constatato recentemente da *Rein*, che la dilatazione dei vasi coronari dopo denervazione del cuore viene ancora regolata da fattori chimici locali, fa ammettere con sufficiente sicurezza che il processo di contrazione come tale agisca regolando la irrorazione coronaria.

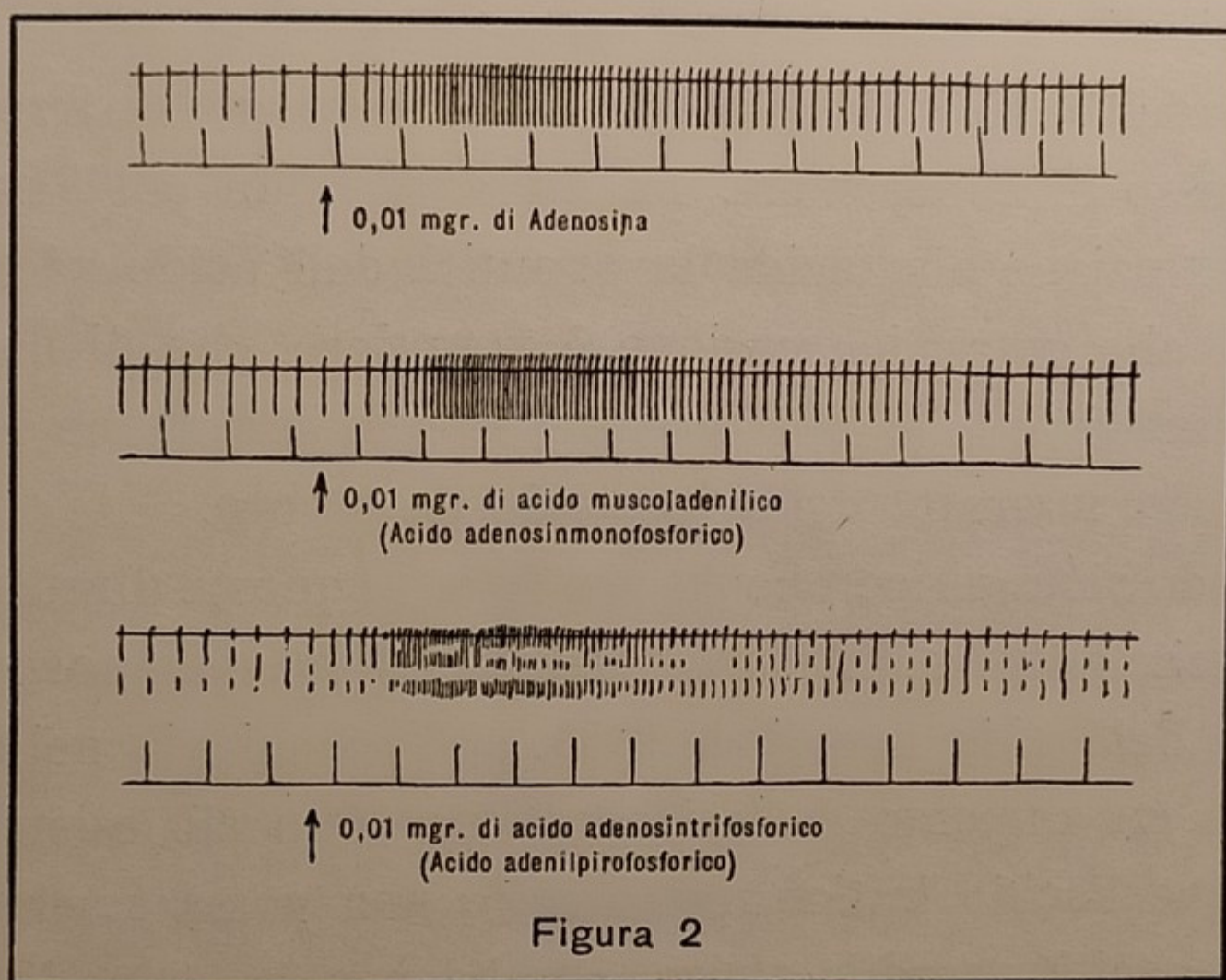
Al riguardo si devono in un primo tempo non prendere in considerazione i fattori meccanici che sono stati messi in chiaro dalle ricerche di *Anrep*, *Häusler*, *Davis*, *Little* e *Volhard jun.* Si potè cioè constatare che l'aumento spontaneo della frequenza del cuore isolato di animali a sangue caldo irrorato col liquido di Ringer si accompagna, in conseguenza della scomparsa dei disordini di conduzione, a un aumento, che si inizia nello stesso momento, della irrorazione delle coronarie; che viceversa colla diminuzione del numero delle contrazioni ventricolari, col ripristinarsi del disordine della conduzione, la irrorazione delle coronarie diminuisce. Questo reperto comporta essenzialmente una conferma dell'aumento della irrorazione delle coronarie osservato da *Sassa*, *Miller*, *Smith* e *Graber* al cuore isolato quando la frequenza viene artificialmente aumentata. Ma si comprende senz'altro che questa interdipendenza non si manifesta in tutte le circostanze, perchè con ogni aumento del numero delle pulsazioni aumenta in pari tempo nella unità di tempo la durata della occlusione sistolica del circolo coronario. La presenza di maggiori quantità di adenin-nucleotide nel cuore, dati gli stretti rapporti di questa sostanza col processo di contrazione, fa apparire razionale di mettere con ciò in rapporto anche l'irrorazione coronaria che aumenta coll'aumentare della frequenza. Già *Hochrein*, *Keller* e *Mancke* hanno richiamato l'attenzione sulla possibilità che la vasodilatazione nel miocardio sia provocata da prodotti del ricambio della sistole trascorsa. Una parte dell'effetto dei preparati organici usati in Clinica, ad es. del Lacarnol, che è titolato con un determinato contenuto in adenosina, diviene spiegabile con quanto sopra si disse. Limitatamente al-

l'uso di esso per via orale, questo uso ha forse avuto, come ritiene *Morawitz*, un antecedente nella terapia largamente usata in passato a base di « beaf tea ».

Onde meglio spiegare le basi chimico-fisiologiche dell'ipermia da lavoro si fecero nel nostro Laboratorio delle ricerche su un test che permette di meglio controllare gli stimoli e la successione degli stessi. All'uopo si scelse per motivi determinati (in vista dell'avvelenamento della rana da acido monojodacetico, avvelenamento esattamente studiato) il preparato di *Laewen-Trendelenburg*, il quale venne disposto in modo che, oltre ad un'esatta misurazione dell'ampiezza dell'irrorazione, si potesse mediante stimolazione elettrica indiretta mettere contemporaneamente in attività la muscolatura. Per poter osservare in questo preparato una condizione paragonabile a quella dell'ipermia da lavoro quando si proceda alla stimolazione elettrica della muscolatura, è tuttavia necessario di badare ad ottenere una reattività vasale quanto più a lungo possibile uniforme, nonchè a conservare il tono vasale, il che si ottiene con una soluzione di Ringer all'uopo modificata da *Kochmann*, con l'aggiunta di adrenalina nella proporzione di 1:100 milioni e di siero di cavallo nella proporzione dell'1‰. In preparati in tal modo ottenuti, un tetano di due secondi provocò già, come dimostra la figura antecedente, un aumento intenso e prolungato della irrorazione. Siccome questo effetto si produce anche nei muscoli avvelenati coll'acido monojodacetico e in quelli avvelenati con atropina (per questa ultima però soltanto con certe restrizioni), la maggiore irrorazione non può essere ascritta alla produzione di acido lattico o di sostanze acetilcolina-simili. Il reperto del muscolo avvelenato con acido monojodacetico conferma uno studio fatto recentemente nel Laboratorio di *Krogh*.

Nello stesso preparato, v. fig. 2, anche l'adenosina, l'acido adenilico e l'acido adenosin-trifosforico aumentano chiaramente la irrorazione già a dosi bassissime (0,01 mgr.). Inoltre si è constatato che il liquido che fluisce attraverso un muscolo

in lavoro acquista spesso la proprietà di divenire vasodilatatore anche nel muscolo in riposo. Nei casi nei quali il tentativo di trasporto di questa facoltà riesce, si potè dimostrare che l'azione vasodilatatrice del liquido irrorante, ottenuto in periodo di contrazione, può essere ridotta a zero col riposo prolungato, dal che risulta un parallelismo col «veleno rapido», così designato da *Freund*, e con le sostanze che *Zipf* chiarì essere composti dell'acido adenilico. La resistenza verso la idrolisi ammoniacale fa apparire inverosimile una essenziale partecipazione dell'acetilcolina alla produzione della iperemia da lavoro. Per quanto



la diretta dimostrazione chimica dell'acido adenilico non sia ancora riuscita, e deve anche essere difficile riesca, soprattutto per la tenuità della sua presenza, pur tuttavia il materiale di fatto sinora noto parla a favore della partecipazione di esso alla aumentante capillarizzazione del muscolo in lavoro.

Poichè già quantità straordinariamente piccole di acido adenosintrifosforico (0,01 mgr.) provocano nel preparato vasale di rana un notevole aumento della irrorazione, e d'altra parte il contenuto di questa sostanza nella muscolatura secondo le analisi chimiche di *Meyerhof* e *Lohmann* è parecchie migliaia di volte superiore, si deve dedurre che nel muscolo scheletrico in

riposo, intatto, l'acido adenosintrifosforico non è presente in forma libera, diffusibile; opinione questa che è divisa anche da *Hill* e *Parkinson*. *Hill* a sostegno di questa opinione fa notare che pur essendo la diffusione dell'acido adenosintrifosforico libero relativamente buona, il muscolo in riposo non cede tuttavia acido adenosintrifosforico alla regione attorniante.

Le nostre ricerche parlano del pari per il concetto che nel muscolo in riposo l'acido adenosintrifosforico è presente in una forma preliminare senza effetto sul circolo, forma che per migliore comprensione chiameremo « apyrogen ».

Per chiudere accenneremo ancora al quesito, quale parte il ricambio dell'acido lattico abbia per l'ampiezza di irrorazione, nel processo di contrazione. Da *Lundsgaard* in poi è noto, che nella contrazione alactacida la quantità dell'acido adenosintrifosforico che entra in reazione è maggiore che di norma. In talune circostanze ciò può trovare espressione anche nella durata e nella intensità della iperemia da lavoro.

Secondo alcune ricerche da noi fatte in questa direttiva, sembrano anche esistere differenze rispetto al muscolo normale. Per influenza dell'acido monojodacetico può aversi già nel muscolo in riposo un aumento della irrorazione. Con ciò esiste la possibilità che l'acido lattico, per quanto non possa essere negata la sua capacità vasodilatatrice, non ha per se stesso il compito di dilatare i capillari. Al contrario, ostacolerebbe o abbrevierebbe una troppo spiccata capillarizzazione del muscolo durante il lavoro, in quanto che producendosi, fornisce le energie necessarie per la ricostruzione dell'apyrogen, cui non spetta azione dilatatrice sui capillari. A questo proposito può essere interessante il rilievo che il ricambio dell'acido lattico fu trovato alterato, nel senso di una difficile formazione di acido lattico, da *v. Arvey* e *Lengyel* nella insufficienza surrenale, la quale per certi lati è uguale al quadro dell'avvelenamento da istamina, ossia è caratterizzata da perdita del tono proprio dei capillari dei muscoli.

Studi sulla serie degli alcaloidi della china.

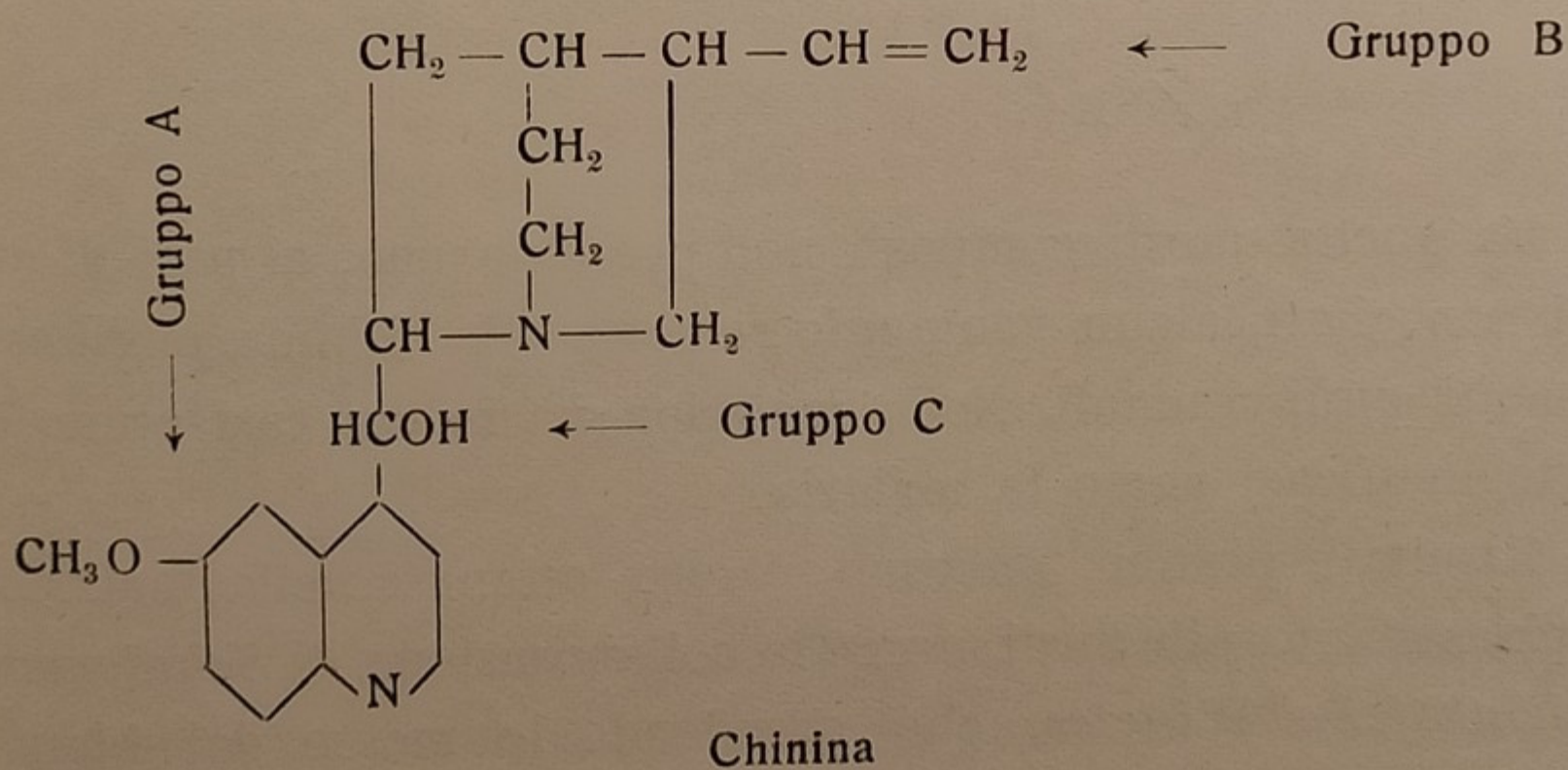
DR. FRITZ SCHÖNHÖFER

Dal Laboratorio chimico di ricerche della I. G. Farbenindustrie A. G.,

Werk Elberfeld.

Colla nozione della esatta formula di costituzione della chinina, i chimici ebbero direttive per ottenere sinteticamente rimedi antimalarici. Ma soltanto un aumento notevole dell'efficacia poteva comportare un valore pratico per la cura della malaria umana e nello stesso tempo vantaggi scientifici.

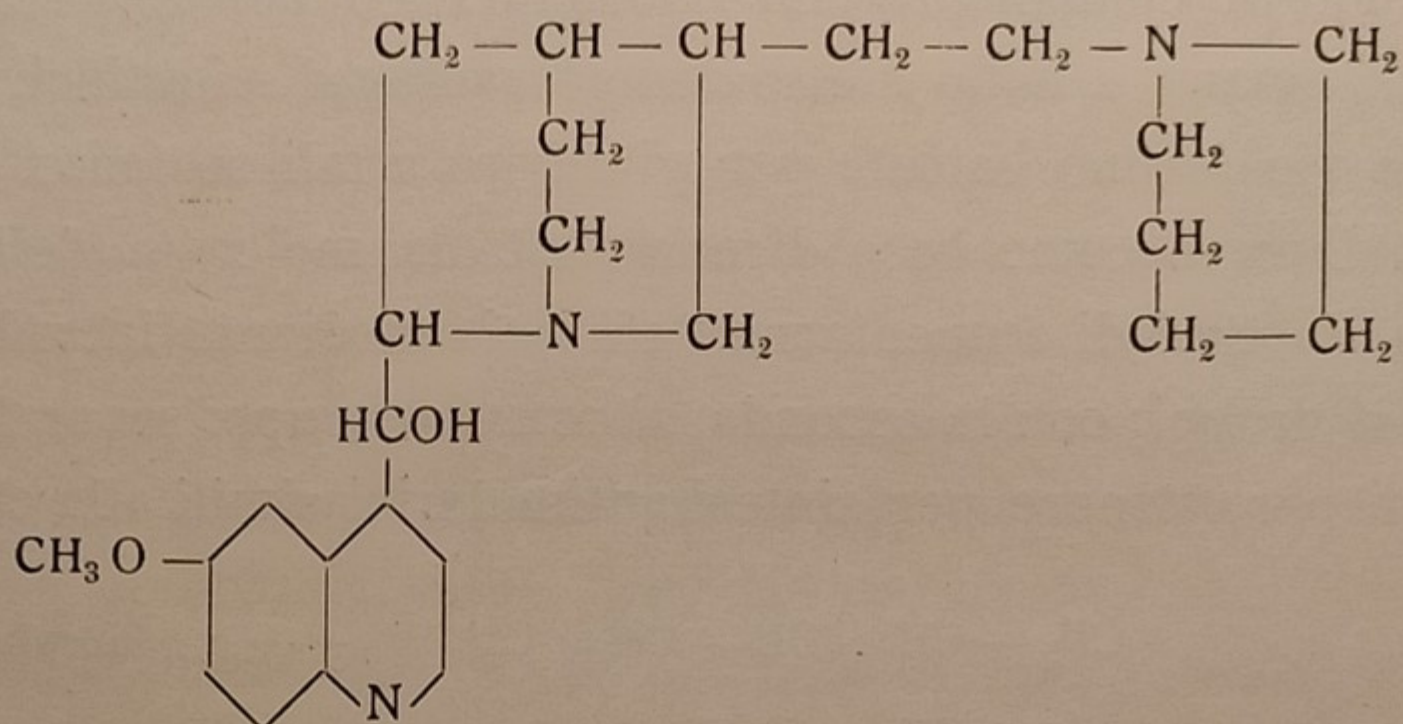
Due vie furono battute per giungere a tali sostanze. Con la prima si prese come base direttamente la molecola della chinina e si cercò di aumentarne l'efficacia mediante introduzione di nuovi gruppi; con la seconda, si usarono gruppi separati della chinina per ottenere per sintesi antimalarici simili alla chinina.



La prima via fu seguita soprattutto da *Morgenroth* e *Giems*a e collaboratori. *Morgenroth* concentrò i suoi sforzi nella introduzione dei più vari radicali alchilici nell'aggruppamento A (formula I). Con ciò si ottennero sostanze, che risultarono attive in malattie batteriche. *Giems*a d'altro lato elaborò soprattutto il gruppo B (formula I); constatò tra altro che la introduzione di un radicale acido, in luogo del gruppo vinilico della

molecola chininica, fa scomparire completamente l'effetto antimalarico.

Roehl enunciò la teoria che forse si poteva aumentare l'effetto antimalarico della chinina rendendo la molecola chininica « fortemente basica ». Io ho cercato di realizzare chimicamente queste considerazioni teoriche. Sono riuscito a preparare sinteticamente una serie di sostanze, che rispondevano a questi requisiti, mediante introduzione di gruppi basici nella molecola chininica, come si vede ad es. nella formula II.

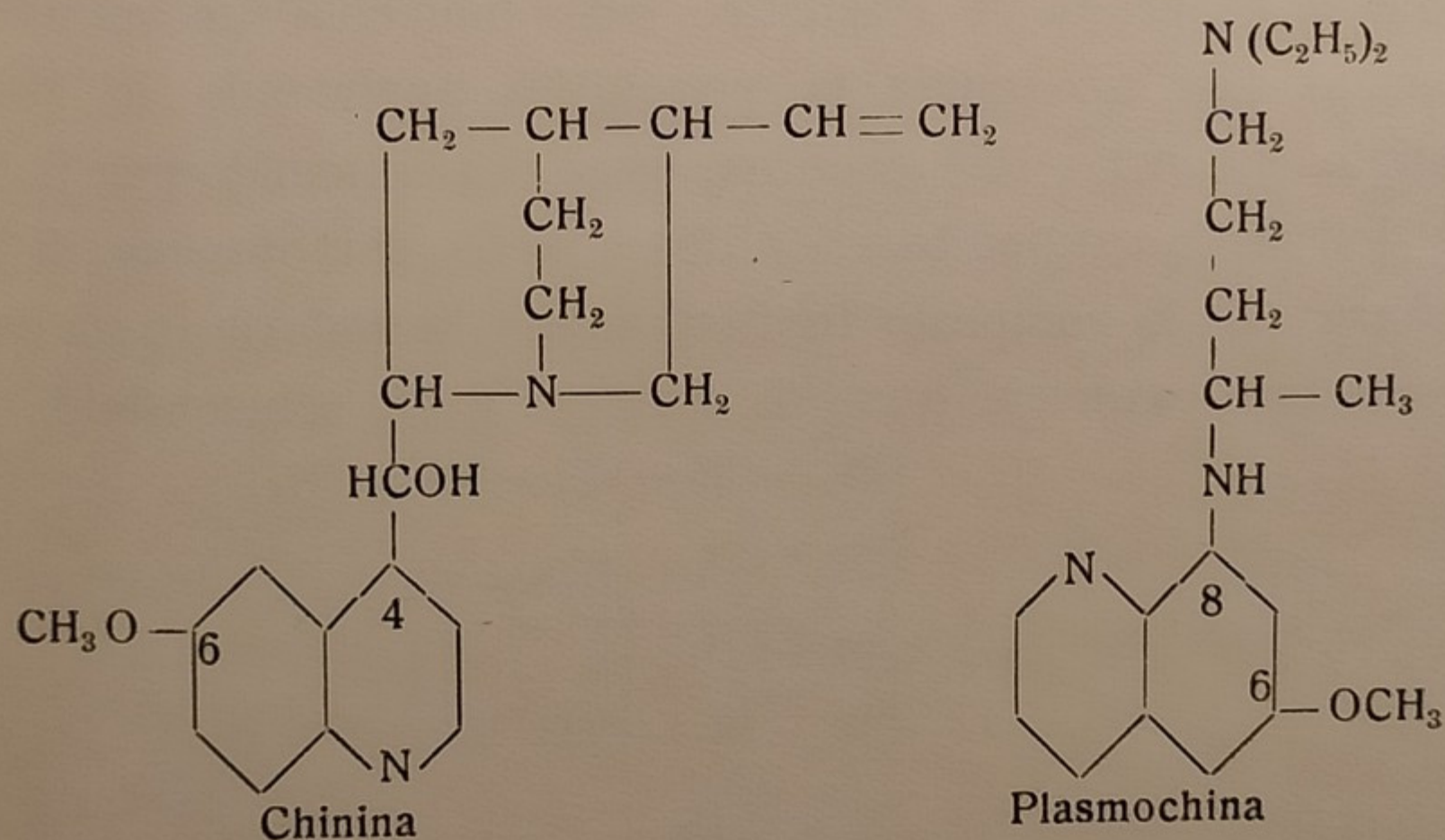


II

Ma anche questi composti non presentarono, al pari di altri qui non citati, alcun vantaggio rispetto alla chinina negli esperimenti sugli animali. Nella maggior parte dei casi erano del tutto inefficaci verso la malaria.

Risultati pratici poterono essere ottenuti nella malarioterapia soltanto più tardi mercè la collaborazione di *Schulemann*, *Schönhöfer* e *Wingler*, che prendendo le mosse dal bleu di metilene sintetizzarono con la Plasmochina un derivato della chinolina efficace contro la malaria. Esso si distingue dalla chinina specialmente per ciò, che nella Plasmochina il gruppo basico-alifatico è legato per il tramite di un gruppo azoto al gruppo benzolico della chinolina, mentre nella chinina, come dimostra il raffronto qui riportato, il ponte tra il primo gruppo e il radicale chinolinico, e più precisamente il nucleo piridinico, è una catena di carbonio.

La Plasmochina è risultata da esperienze chemioterapiche e cliniche un antimalarico sintetico efficace e sicuro. Ma ben presto si riconobbe che aveva proprietà terapeutiche diverse da quelle della chinina. Questo diverso modo di agire si manifesta soprattutto nella malaria tropicale (estivo-autunnale). Cioè, mentre in questa infezione la chinina agisce sul ciclo di sviluppo asessuato dei parassiti malarici (schizonti) e non ha quasi alcuna influenza sulle forme sessuate dei parassiti (gameti), l'azione della Plasmochina è proprio opposta. La Plasmochina non potè pertanto sostituire la chinina nella cura di ogni manifestazione di malaria e per ottenere un optimum di effetto curativo si devono usare i due medicamenti contemporaneamente.

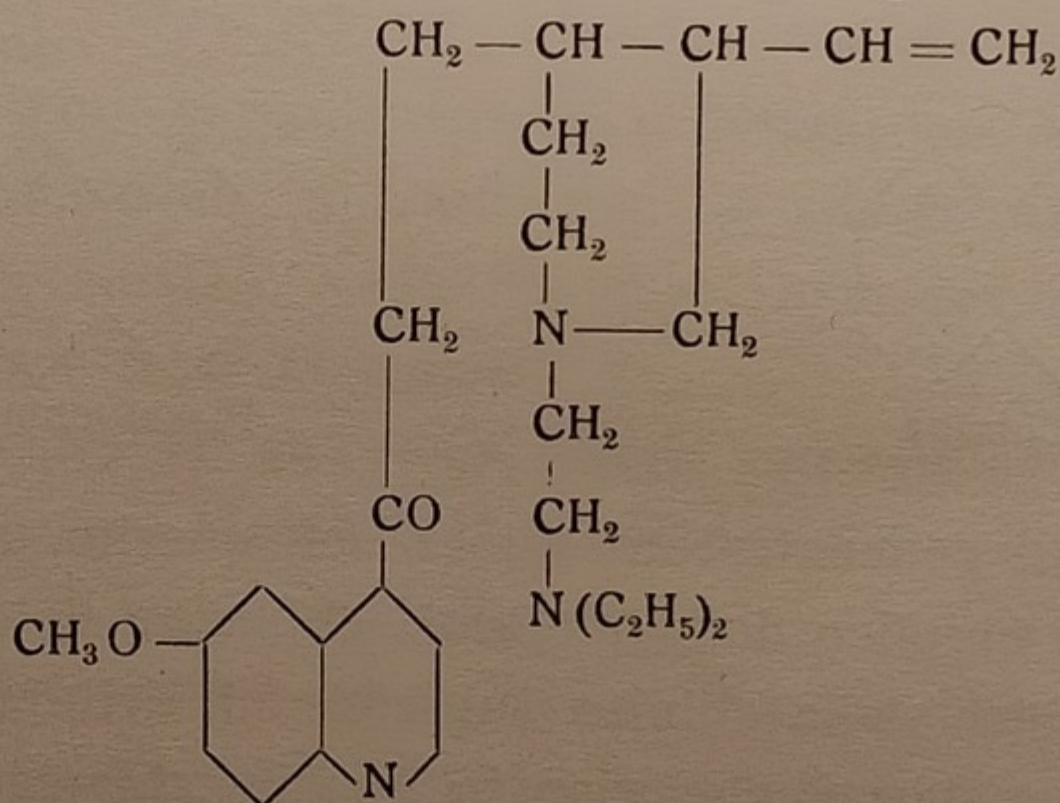


Gli studi si concentrarono allora sul quesito, a quale aggruppamento chimico della molecola chininica sia da ascrivere l'effetto specifico della chinina sul ciclo di sviluppo asessuato dei parassiti malarici, che sono in genere chiamati schizonti. Questi studi ebbero in un primo tempo interesse esclusivamente scientifico. Se cioè si fosse riusciti a stabilire da quale aggruppamento della molecola chininica viene esercitata l'azione sugli schizonti, si sarebbe aperta una nuova via per sintetizzare da altri composti semplici e ottenibili con facilità sinteticamente, degli antimalarici simili alla chinina.

Le modificazioni chimiche nel gruppo A e B (formula I), come già si è ricordato, non avevano portato alcun chiarimento sull'azione specifica sulla malaria.

Ma un'altra possibilità risultava dal fatto, che il gruppo C della molecola chininica (formula I) poteva essere chimicamente modificato. Era comunque già noto in passato, che colla eterificazione del gruppo alcoolico l'effetto antimalarico si mantiene. D'altra parte con la trasformazione del gruppo alcoolico in gruppo chetonico, ossia colla trasformazione della chinina in chinotossina, questa sostanza, come già aveva constatato *Giemsa*, cessava di agire sulla malaria degli uccelli.

Ma il gruppo chetonico ha in genere rispetto al gruppo alcoolico la proprietà di impartire alla molecola un carattere più acido. Con ciò veniva la possibilità, applicando lo stesso principio che nella Plasmochina, ossia introducendo per il tramite dell'azoto gruppi basici alifatici nella chinotossina, di trasformare questo composto inattivo contro la malaria in un composto attivo e con ciò forse di ottenere degli schizonticidi.

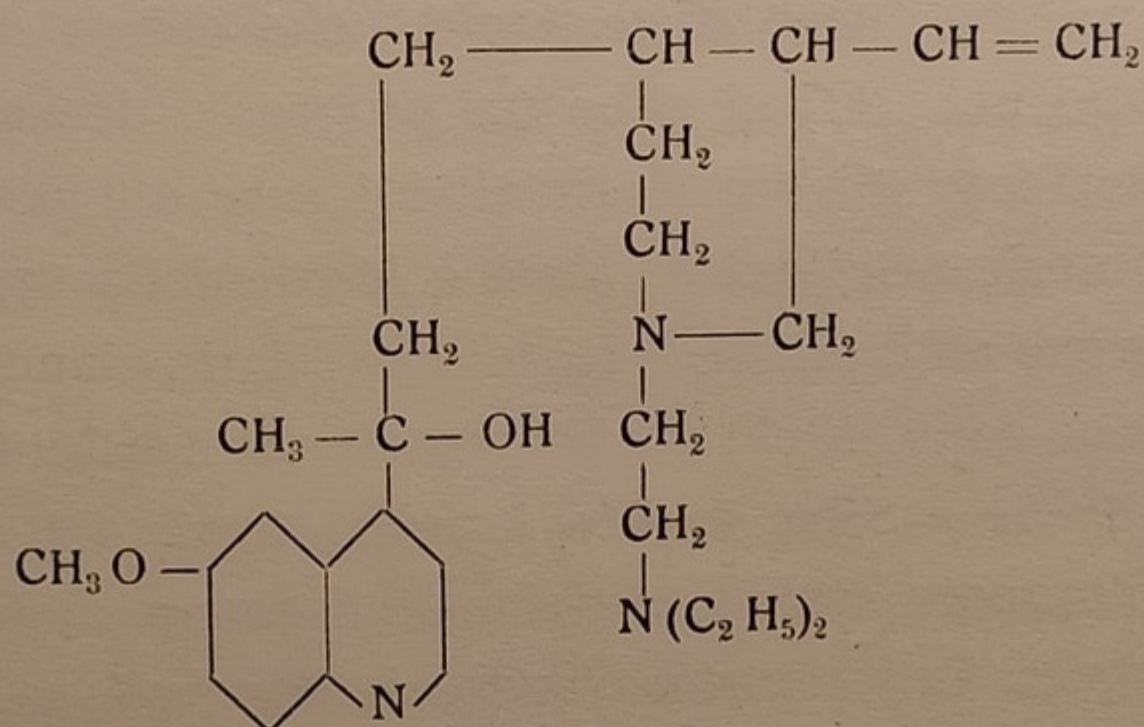


II.

Partendo da queste considerazioni intrapresi ricerche con tali direttive. Riuscii mediante introduzione di radicali basici nella chinotossina ad ottenere composti, quali ad es. trovano espressione nella formula III. Ma questo prodotto non aveva corrisposto alla mia aspettativa; non era neppure con esso constatabile un effetto antimalarico.

Però, fatto sorprendente, questo composto presentava proprietà farmacologiche che non sono proprie nè della chinina nè della chinotossina, ma vengono osservate in un gruppo tutto diverso di alcaloidi. Alludo ad una proprietà spasmolitica, quale si constata nella papaverina. Era dunque avvenuto che con la modificazione chimica di un alcaloide della china si erano prodotte proprietà farmacologiche, che sono caratteristiche di un composto il quale fa parte degli alcaloidi dell'oppio.

Ma quando questo composto col radicale basico, similmente che nella chinina, fu trasformato in un alcool, nel caso speciale in un alcool terziario (formula IV), scomparve con ciò l'azione papaverina-simile, ricomparvero le proprietà farmacologiche chinina-simili; mancava però l'effetto antimalarico.



IV

Per quanto queste variazioni della molecola chininica non abbiano dato risultati pratici, pur tuttavia appaiono teoricamente interessanti. Esse dimostrano che è possibile mediante modificazione chimica della costituzione di variare ampiamente le proprietà della chinina, ossia di ottenere dei composti, che non sono più nè antipiretici nè antimalarici, ma sono invece disinfettanti (*Morgenroth*), oppure, come è risultato dalle mie esperienze, spasmolitici.

La standardizzazione dell'ormone sessuale maschile.

DR. RUDOLF FUSSGÄNGER.

Dall'Istituto Farmacologico della I. G. Farbenindustrie A. G.,
Werk Hoechst.

I.

La secrezione interna della glandola sessuale maschile è quella che, tra le altre secrezioni interne, fu studiata da più lungo tempo. Ma benchè già nel 1849 *Berthold* avesse riferito di tentativi di trapianto nei gatti castrati, e nel 1889 *Brown-Séquard*, allora in età di 72 anni, avesse fatto conoscere le sue autoesperienze col succo di testicolo - che ebbero una grande eco -, soltanto nel 1927 si ebbe un progresso decisivo, quando indipendentemente gli uni dagli altri *Loewe* e *Voss* in Germania, e in America *Gallagher*, *Koch* e *Moore* della scuola di Chicago, riuscirono ad ottenere estratti attivi dalle glandole sessuali maschili. Poco dopo (1929) anche *Laqueur* di Amsterdam, *Thales Martins* e *Rocha e Silva* di Rio Janeiro, *Funk* e *Harrow* in Inghilterra ottennero estratti attivi e indicarono metodi di test. Da questa epoca la letteratura endocrinologica è assai ricca di lavori sul modo di preparazione e sui metodi di dimostrazione dell'ormone sessuale maschile. Nel 1932, *Butenandt* di Gottinga poté riferire - e con ciò ho in pari tempo ricordato i nomi e i luoghi più importanti degli studi relativi - di essere riuscito ad ottenere l'ormone cristallizzato; si poté così cominciare a studiarne la composizione.

Come fu possibile il rapido sviluppo di questi ultimi 5 anni, mentre ricercatori di grande valore - cito qui soltanto *Biedl*, *Steinach*, *Harms*, *Lipschütz* e *Pézard* - si erano occupati a fondo dell'argomento senza riuscire ad ottenere estratti utilizzabili? La ragione sta d'un lato nella mancanza di un metodo sensibile di test che permettesse di seguire esattamente, rapi-

damente e in modo univoco l'effetto dell'ormone, d'altro lato nel fatto che l'ormone maschile è presente nel testicolo soltanto in quantità straordinariamente piccole. Ancor oggi non si ha alcun metodo chimico di dimostrazione; restano dunque soltanto le esperienze sugli animali. Quando furono elaborati metodi adattati per queste esperienze, riuscì facile di andare alla ricerca dell'ormone maschile nei più vari organi e succhi animali, nonché nelle piante.

Le quantità relativamente più grandi sono contenute nel testicolo. Quantità relativamente grandi vengono anche eliminate nell'urina degli uomini (*Loewe, Voss, Funk e Harrow*). L'ormone è contenuto nell'epididimo in quantità circa uguale che nel testicolo (*Gallagher*). *Busquet* lo trovò nel sangue del toro. *Loewe, Rothschild e Voss* lo isolarono dalla bile e dalle feci di uomini.

È tuttavia fatto sorprendente che molto recentemente si è trovato l'ormone maschile anche nell'organismo femminile e nei prodotti di secrezione di esso, come dall'organismo maschile si è potuto isolare l'ormone follicolare.

Il luogo principale di produzione dell'ormone maschile è indubbiamente il testicolo, tuttavia è ancora sub judice in quali elementi cellulari dello stesso. Essenzialmente le opinioni sono due: mentre alcuni, basandosi sulle ricerche fondamentali di *Bouin e Ancel*, ne fissano il luogo di produzione nelle cellule interstiziali del testicolo, nella «glandola interstiziale» (*Steinach, Aron, Bourg, Foncin, Kraus, Courrier, Lipschütz*), altri credono di avere in mano dati sicuri per affermare che la formazione dell'ormone avviene nelle cellule germinative stesse (*Romeis, Harms, Stieve, Slotopolsky*). Altri ancora considerano le cellule di Sertoli il luogo di produzione (*Pézard, Kudrjaschhof*).

Per analogia a quanto avviene nella glandola sessuale femminile, che produce l'ormone follicolare e il corpo luteo, molti studiosi credono - in base a ricerche comparative con vari metodi di test - che ci siano parecchi, almeno due, ormoni ses-

suali maschili. *Champy*, *Freud* e *Laqueur* deducono la presenza di un secondo ormone in base al diverso comportamento dei loro estratti sul test cresta di gallo e su quello vescicola seminale, dei quali si dirà. *Martins* sostiene il dualismo in base a ricerche di parabiosi. Recentemente *Freud* crede che queste discrepanze trovino spiegazione nella mescolanza dell'ormone follicolare, in qualità di co-sostanza.

II.

Quali metodi abbiamo a disposizione per il saggio biologico di preparati test, e quali sono adatti per la standardizzazione regolare dell'ormone sessuale maschile?

Di valore generale è il presupposto della specificità del test, ossia la reazione deve essere provocata soltanto dall'ormone maschile. Il secondo fattore di importanza essenziale è il tempo occorrente per ottenere risultati sicuri. Un altro elemento è la sensibilità, ossia la possibilità di ottenere effetti evidenti già con piccole quantità di ormone, nonché il rapporto tra dose ed effetto. Ma per la standardizzazione abituale ha anche grande importanza il consumo di materiale, tanto di sostanza iniettata quanto anche del materiale «animale». Infine si deve esigere che il test sia praticabile facilmente. Prendiamo ora a considerare da questi punti di vista i diversi test.

Una gran parte di questi metodi si basa su osservazioni per lo più di antica data, secondo le quali colla castrazione di animali maschi, in conseguenza della cessazione della produzione dell'ormone maschile, regrediscono in linea generale i caratteri sessuali maschili secondari. Orbene se a tali animali si inietta un estratto attivo, in molti casi si riesce ad arrestare o a rallentare queste alterazioni regressive, oppure se le alterazioni regressive si sono già espletate, ossia se è passato molto tempo dalla castrazione, a renderle di nuovo reversibili. Nel primo caso parliamo di test «profilattico», nel secondo di test «riparatorio». Un'altra possibilità è questa: somministrare ad un animale infantile, con glandola sessuale non ancora funzionante, dell'ormone sessuale e fare così sviluppare i caratteri sessuali secondari. Senza voler qui enumerare tutte le possibilità colle quali si riesce a rimediare alle conseguenze di tipo mor-

fologico o funzionale della castrazione, diremo soltanto dei metodi che sono stati usati o proposti per i test.

Un esempio tipico offertoci dagli animali a sangue freddo è il riflesso dell'abbraccio dei giovani maschi di rana, che non si produce più se gli animali vengono castrati. In base ad osservazioni di *Nussbaum, Harms, Steinach e Biedl, Mc. Cartney James* ha elaborato un test che usufruisce di questo riflesso. Egli definisce unità quella più piccola quantità di ormone testicolare che è in grado, iniettata che sia nella sacca linfatica dorsale, di provocare il riflesso dell'abbraccio nelle rane invernali adulte. Finora questo metodo non è stato controllato. Esso non sembra essere sufficientemente specifico.

Un metodo di test sui pesci hanno recentemente ideato *Glaser e Hämpel* e indipendentemente da loro *Wunder*. *Glaser e Hämpel* usarono dei pardelli (*Cyprinus amarus*) castrati, i cui piccoli maschi all'epoca della fregola si vestono di un così detto abito di nozze. Dopo la castrazione questa colorazione di nozze non si produce più spontaneamente; si produce invece dopo iniezione di estratto testicolare. Viene detta « Unità pesce » la più piccola quantità di ormone che è in grado di provocare in almeno tre su quattro maschietti pardelli di dimensioni pressochè uguali, che siano stati castrati almeno 30 giorni prima o da tempo più lungo, un abito di nozze che si mantiene per 4-5 ore. Il grande vantaggio del metodo sta nel breve tempo occorrente perchè si produca la colorazione e nella facilità di procurarsi il materiale. Sono svantaggi in primo luogo le perdite provocate dalla castrazione ma soprattutto il fatto, che gli afrodisiaci (*Yohimbina*) ed altre sostanze aspecifiche provocano il colore di nozze perchè l'effetto dipende da iperemizzazione. Il test non è dunque affatto specifico.

Va ricordato ancora un metodo ideato da *Stanley e Tescher* e che consiste in ciò: aumentare la vivacità di pesci rossi mediante somministrazione di estratto testicolare e registrare graficamente i movimenti dei pesci.

La maggior parte dei tentativi di standardizzazione dell'ormone testicolare fu però fatta in mammiferi e soprattutto in piccoli rosicchianti: ratto, cavia e topo. Tuttavia già il gran numero di queste ricerche sta a dimostrare che con esse non si è riusciti a trovare un buon test.

Dei tentativi di *Loewe* e *Voss* di ottenere la trasformazione del pene di conigli castrati in organo normale, o la formazione degli organi spinosi del fondo cieco nel pene della cavia, possiamo non occuparci, dato il lungo tempo che richiedono; del pari del test di *Wang* e *Hoskins*, di ripristinare la piena vivacità di animali normali in ratti castrati, perchè la valutazione è subiettiva.

Importanti invece i tentativi che hanno lo scopo o di evitare (test profilattico) le conseguenze della castrazione negli organi accessori dell'apparato sessuale maschile, oppure (test riparatore) di rimettere in funzione organi sessuali già regrediti: sono essi la prostata, le vescicole seminali, le glandole di Cowper, il vas deferens e le glandole prepuziali. Le vescicole seminali devono essere considerate a parte. Gli altri organi accessori presentano tutti nei ratti successivamente alla castrazione un'atrofia e anche al microscopio alterazioni regressive della struttura della mucosa, alterazioni che colla cura di ormone testicolare possono essere fatte regredire. In generale i ratti devono essere per questi metodi di test castrati 90-100 giorni prima che si inizi il trattamento, il quale dura in media 20 giorni.

Moore e *Gallagher* chiamano « Unità ratto » la più piccola quantità di ormone, che iniettata giornalmente mantiene in condizioni normali gli animali castrati. L'effetto sulla struttura citologica di questi organi è molto minore che alle vescicole seminali. Il tempo richiesto è troppo lungo per un test. Queste ricerche sono legate rispettivamente ai nomi di:

Prostata: *Moore*, *Price*, *Gallagher*, *Steinach* e *Korenschevsky*.

Glandola di Cowper: *Heller*.

Vas deferens: *Bénoit*, *Moore*, *Vatna*, *Gallagher*.

Glandole prepuziali: *Loewe* e *Voss*.

Loewe e Voss si sono occupati molto a fondo delle vescicole seminali. Essi hanno basato il loro metodo esclusivamente sulle modificazioni che la struttura citologica presenta dopo la castrazione. Con essa le glandole vescicolari si atrofizzano, l'epitelio diventa da piatto a cubico e povero di cellule, mancano granuli di secreto, il secreto diminuisce nel lume e diviene cromofobo. Somministrando ormone maschile, tutte queste conseguenze della castrazione si cancellano.

Loewe e Voss usarono per il « test citologico di rigenerazione » (Test I - C.R.) dei topolini maschi che erano stati castrati in precedenza. Originariamente l'esperienza durava dieci giorni, invece col così detto test rapido, si inietta soltanto per tre giorni. Gli animali vengono uccisi 48 ore dopo l'ultima iniezione. Onde abbreviare ancor più il tempo necessario, i due autori tennero conto soltanto della rigenerazione iniziale delle vescicole seminali e determinarono soltanto il numero delle mitosi in un determinato campo visivo delle sezioni istologiche (test della mitogenesi). Con questa variante gli animali vengono uccisi 48 ore dopo un'unica iniezione. Per quanto sembri che questi tre metodi siano specifici e che le modificazioni istologiche siano ottenibili con poca sostanza testicolare, pur tuttavia per usare detto metodo ci vuole una così profonda conoscenza della struttura istologica, che il test può dare risultati utilizzabili soltanto nelle mani di indagatori esercitati.

Muto-Chuij si vale invece delle modificazioni macroscopiche della vescicola seminale e della prostata del topo. Colla somministrazione di ormone testicolare egli poté arrestare l'atrofia della vescicola seminale successiva alla castrazione e giudicare il risultato in base al peso degli organi. Similmente procedono *Martins, Rocha e Silva*.

Con ricerche personali io mi sono convinto che usando un materiale topo uniforme si riesce ad arrestare - misurata in peso - l'atrofia delle vescicole seminali successiva alla castra-

zione, e che per avere un test utilizzabile basta fare le ricerche in grandi serie.

Oltre che da *Amson*, le vescicole seminali dei ratti sono già state ripetutamente usate da altri come test. In base alle osservazioni di *Pézard* e *Gley*, *Moore*, *Hughes* e *Gallagher*, *Dodds* e *Greenwood* hanno usato la reazione istologica della vescicola seminale del ratto per provare i loro estratti testicolari, senza per altro elaborare un metodo esatto di test. Attualmente *Korenschevsky* studia un test vescicola seminale-prostata. Se ne sono occupati soprattutto *Freud* e *Laqueur*, tenendo conto del peso della vescicola seminale del ratto. Designano come « Unità vescicola seminale » quella più piccola quantità che ripartita in due iniezioni al giorno e iniettata a giovani ratti maschi del peso di 25-45 gr. dal 4° al 7° giorno dopo la castrazione fa aumentare il peso delle glandole seminali a oltre 18 mgr.

Se si fa passare attraverso il capo di una cavia maschio una corrente elettrica, si produce dopo breve tempo erezione ed eiaculazione.

La quantità principale dell'eiaculato è costituita da secreto della vescicola seminale, che coagula rapidamente. Nei maschi castrati non si ha invece quasi mai la coagulazione. Ma se si sono trattate tali cavie con preparati di testicolo, la coagulazione dell'eiaculato si produce. Questa osservazione fatta da *Batelli* fu usata come test da *Moore* e *Gallagher* (test della eiaculazione), test che fu in seguito usato anche da *Kabak* nonché da *Cuny* e *Quivy*. La coagulazione si produce però spesso anche in animali castrati non trattati. La incertezza dell'effetto, la relativa insensibilità e la difficoltà dell'esecuzione non fanno apparire adatto questo test come metodo di standardizzazione.

Se ad una cavia si estirpa un testicolo, gli spermatozoi restano in vita ancora per 60 giorni nell'epididimo pertinente; se invece si castra l'animale completamente, la motilità degli spermatozoi cessa già dopo 23 giorni (*Bénoit*). Con estratti testicolari si riesce a mantenere in tali animali castrati la motilità

degli spermatozoi nell'epididimo oltre i 23 giorni. Questo « test della motilità degli spermatozoi » elaborato da *Moore* non si è diffuso non fosse che per il fatto che richiede troppo tempo.

Un altro mezzo di test dell'ormone maschile fu descritto da *Martins*. Se si castrano dei rattini maschi infantili, dopo 2-3 settimane si possono dimostrare nella ipofisi degli animali le cosiddette « cellule da castrazione ». Con estratti testicolari la formazione di queste cellule da castrazione può essere inibita in modo tale, che nelle sezioni non se ne vedono che poche. Il test deve dare risultati positivi con $\frac{1}{50}$ delle dosi, che agiscono ancora appena sulle glandole accessorie. Il test è complicato per la necessità dello studio istologico della ipofisi, inoltre richiede dieci giorni per avere un risultato univoco.

Anche le modificazioni del ricambio che si constatano per effetto della castrazione, e il ritorno di esse alla norma dopo trattamento ormonico sono state oggetto di studio. Le vecchie ricerche di *Loewy* e *Richter* vanno scartate perchè troppo aspecifiche.

Recentemente *Peritz* ha ideato un metodo il quale si basa sul fatto, che lo zucchero fatto ingerire a ratti adulti normali è già bruciato dopo una mezz'ora (secondo quanto risulta dal quoziente respiratorio). Nei ratti castrati questa combustione è ritardata; la somministrazione di ormone testicolare la ricondurrebbe alla norma.

Mentre finora tutti i metodi descritti si muovevano nella direttiva di eliminare o almeno di ritardare le conseguenze della castrazione, *Lendle* ha seguito una via tutta diversa, ha cioè utilizzato l'effetto dell'ormone maschile sull'organismo femminile, ossia la sua azione antifemminile.

Con ricerche numerose di trapianto di glandole sessuali dell'un sesso ad animali dell'altro sesso, nonchè con esperienze di parabiosi si sono potuti ottenere effetti antifemminili e antimaschili. Così *Ihrke* e *d'Amour* poterono in ratti femmine normali eliminare l'estro con la somministrazione di ormone testicolare.

Le stesse osservazioni fece *Lendle* in ratti e topi. Egli elaborò questo metodo a test e iniettò per 5 giorni a ratti femmine di 100 - 200 gr., il cui ciclo di fregola avrebbe un intervallo di 6 - 7 giorni, gli estratti da provare. La inibizione alla fregola venne considerata positiva quando l'intervallo tra quella antecedente e quella seguente fu di almeno 10 giorni. Riguardo al meccanismo di azione, *Lendle* viene alla conclusione che non si tratta sicuramente di un antagonismo diretto, ma di una inibizione del processo di ovulazione. Ritene anche che l'ormone maschile inibisca la fregola per il tramite della ipofisi.

Data la importanza curativa dell'ormone sessuale maschile, sarebbe interessante di avere in mano un test utilizzabile nei mammiferi, ma nessuno dei metodi finora ricordati risponde ai requisiti desiderati. Dobbiamo quindi usare quasi esclusivamente dei metodi elaborati per gli uccelli.

Il metodo di standardizzazione dell'ormone sessuale maschile più importante e più usato è quello della «cresta del gallo». Se si castrano dei galli giovani, la cresta, l'orecchio e i barbigli rimangono piccoli; se si castrano dei galli anziani, i detti organi regrediscono di molto e si fanno pallidi. Orbene *Pézard*, a ciò consigliato da *Gley*, ha praticato trapianti di testicolo e iniezioni di estratti a tali galli castrati, ed ha così ottenuto la scomparsa completa delle conseguenze della castrazione. La cresta si sviluppò fortemente in lunghezza e in altezza, l'orecchio e i barbigli riacquistarono la forma e la grandezza normali.

Queste osservazioni di *Pézard*, che furono confermate da *Walker* e *Lipschütz*, furono poi utilizzate per la prima volta dagli studiosi di Chicago *Mc. Gee*, *Juhn*, *Domm*, *Gallagher* e *Koch* nel 1927 a scopo di prova biologica, ed elaborate a metodo di standardizzazione.

Essi usarono galli bruni di Leghorn, completamente castrati, in età di 1 - 3 anni e designarono come una unità la quantità giornaliera di ormone che è necessaria per ottenere in cinque

giorni un aumento medio di cinque mm. in lunghezza e in altezza in almeno cinque capponi bruni Leghorn. *Womack, Domm, Koch e Juhn* fecero rilevare la influenza che la luce esercita sullo sviluppo della cresta, nel senso che essa inibisce o ritarda l'effetto. La elaborazione del test « cresta di gallo » fu studiata a fondo dagli autori olandesi *Laqueur, Freud e de Fréméry*. *De Fréméry* ha ideato un procedimento semplice per fotografare l'ombra delle creste e per determinare planimetricamente la superficie delle stesse. *Laqueur* definisce l'unità così: quella quantità di ormone maschile, che viene iniettata sottocute in due parti uguali, è la dose giornaliera. Una unità gallo è la più piccola quantità giornaliera che somministrata per 4 giorni consecutivi ad almeno tre galli castrati, causa al quinto giorno (in almeno $\frac{2}{3}$ degli animali) un aumento in superficie di oltre il 15 %.

Oltre a questi autori hanno usato il test della cresta di gallo: *Funk e Harrow* per valutare i loro preparati ottenuti dall'urina umana; *Dodds, Greenwood e Gallimore* per valutare estratti dal testicolo e dall'urina; *Butenandt* per la preparazione allo stato di purezza dell'ormone maschile; inoltre *Schöller e Gehrke, Zavadovsky, Kabak* e altri. Quasi ogni autore ha elaborato una tecnica propria e stabilito una « unità gallo » propria; le esponiamo nella tabella seguente:

	Letteratura	Numero dei giorni di iniezione	Lettura	Sviluppo della cresta	Numero degli animali
1. <i>Erugon</i>	—	5	7° giorno	30 %	3
2. <i>Laqueur</i>	Bioch. Z. 1931, Bd. 231, p. 1	4	5° giorno	15 %	2 di 3
3. <i>Butenandt</i>	Z. f. angew. Chem. 1931, p. 905	2	3° e 4° giorno	20 %	3
4. <i>Schöller e Gehrke</i>	Zahnärztl. Mittlg. 1931, p. 376	2	3° giorno	20 %	2 di 3
5. <i>Gallagher e Koch</i>	Journ. of Pharm. Exp. Therap. 40, p. 327, 1930	5	5° giorno	5 mm. lunghezza + altezza	5
6. <i>Funk, Harrow e Lejwa</i>	Amer. J. of Phys. 92, p. 440, 1930	10	11° giorno	10 mm. lunghezza	6

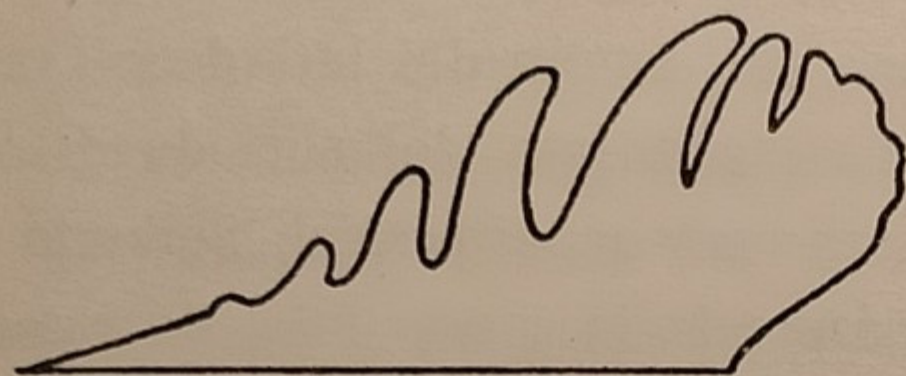
Il test della cresta di gallo risponde a molti dei requisiti che furono indicati in principio per un metodo di test; è specifico, richiede soltanto pochi giorni. Se si hanno in mano estratti attivi, il rapporto tra dose ed effetto è nel limite delle oscillazioni inevitabili, molto favorevole. Ricerche approfondite sui rapporti tra altezza della dose, durata della cura, grossezza della cresta e peso dei galli furono fatte da *Gallagher* e *Koch* nonché da *Freud* e *Laqueur*. Questi autori hanno steso numerose curve dell'effetto, dalle quali risulta che il metodo è praticamente utilizzabile. E' tuttavia necessario che i capponi usati siano stati castrati completamente e siano poi controllati ripetutamente, che le creste tornino a regredire dopo cessazione della cura. Gli animali possono di nuovo essere utilizzati dopo che l'effetto è cessato. Uno svantaggio è costituito dal fatto che il materiale animale è caro e deve essere abbondante, nonché dalle grandi quantità di sostanza che sono necessarie.

In base alle risultanze favorevoli, per valutare il nostro ormone sessuale «Erugon» noi usiamo sempre il test cresta di gallo. Il preparato è titolato a due unità cresta per centimetro cubo. Intendiamo per «unità gallo» la quantità di sostanza che iniettata pro die provoca dopo la quinta iniezione al settimo giorno, calcolato dal principio delle iniezioni, nel gallo bianco castrato Leghorn un aumento della cresta del 30 %.

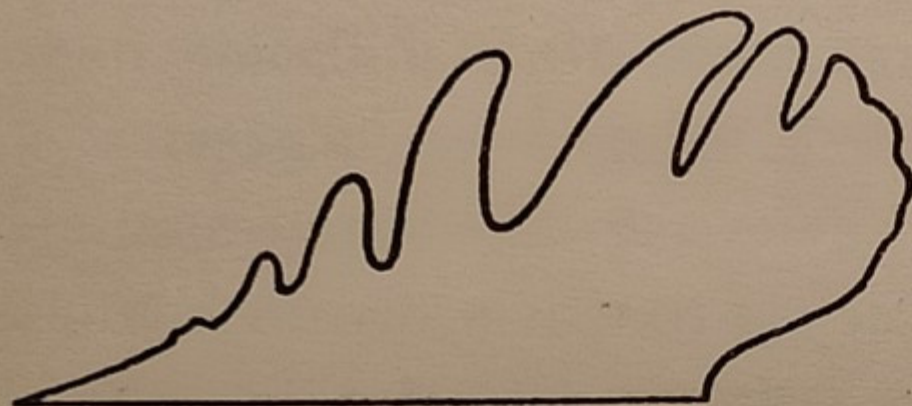
Per chiudere ancora due parole sui rapporti quantitativi che furono finora trovati tra i singoli metodi di test. *Lendle* riferisce che col suo test di inibizione alla fregola intende la quantità di ormone che corrisponde a un estratto di 21 gr. di sostanza testicolare fresca. Siccome in base ad altri dati, da circa 50 gr. di sostanza testicolare fresca si può ottenere 1 U. G. di ormone attivo, una unità gallo corrisponderebbe a $2\frac{1}{2}$ unità inibizione della fregola. *Siebke* non ha potuto riscontrare un rapporto fisso tra le unità dei diversi test. *Loewe* e *Voss* hanno paragonato con maggiore precisione i vari metodi di test. Essi hanno constatato che per il test positivo «cresta di gallo» si deve

dare una dose di ormone maschile 5-10 volte maggiore di quella che provoca una reazione positiva col test C. R.

D'altra parte soltanto dosi così alte che provochino una rigenerazione citologica completa dell'epitelio delle glandole vescicolari, sono in grado di ingrossare macroscopicamente le vescicole seminali.



Prima della cura



Aumento del 30 %
con 1 U. G. di Erugon

Anche *Moore* e *Gallagher* hanno studiato i limiti di sensibilità del test «mammiferi» in raffronto al test «cresta di gallo». Essi trovarono una sensibilità decrescente nell'ordine seguente:

- Motilità degli spermatozoi (10 volte più sensibile del Test C. G.)
- Test citologico della prostata.
- Vescicole seminali, glandole di Cooper, vas deferens.
- Test elettrico di ejaculazione.

Un ventesimo della unità ratto riferito a pag. 200 è ancora attivo per le modificazioni citologiche della prostata. Un sesto ancora sulla vescicola seminale, mentre ad una unità ratto corrispondono circa sei unità gallo.

Infine *Freud* e *Münch*, saggiando estratti greggi di ormone maschile ottenuto dall'urina, trovarono tra la loro unità gallo e la unità ratto un rapporto di 4:1. Il fatto che con una unità gallo otteniamo una modificazione morfologicamente così intensa, come è l'aumento del 30 % della cresta, e il confronto con la sensibilità degli altri test, dimostrano tuttavia che nella

unità gallo abbiamo una unità assai grande. Giammai la cresta di un gallo non castrato cresce in questa età e nello stesso periodo di tempo così intensamente come dopo il trattamento ormonico; ciò vuol dire che noi apportiamo all'animale una quantità di ormone molto più grande di quella che le sue ghiandole sessuali producono nello stesso periodo di tempo.

Riassumendo, dalla discussione sui vari metodi di test risulta in modo univoco che tutti i metodi hanno dei lati deboli, sia per specificità, sia per sensibilità e durata del periodo di osservazione, sicchè non si prestano per scopi pratici. Soltanto il test della cresta di gallo corrisponde in modo tale, da essere il test di scelta per la standardizzazione abituale.

Basi biologiche per la terapia sperimentale delle verminosi.

DR. OSCAR WAGNER.

Dall'Istituto parassitologico della I. G. Farbenindustrie A. G.,
Werk Hoechst.

Le ricerche biologiche degli ultimi due decenni hanno portato gran messe di dati nuovi, che fanno apparire in altra luce le malattie provocate da parassiti. Le più chiare nozioni sui rapporti alterni tra parassiti penetrati e ospite, hanno fatto avvicinare le malattie da essi provocate a quelle dovute a esseri viventi unicellulari. Gli stessi dati che si sono dimostrati utili per la terapia sperimentale delle malattie microbiche, hanno acquistato importanza per quelle da vermi. Metodi di laboratorio che furono elaborati per le malattie provocate da protozoi o da batteri poterono, *mutatis mutandis*, essere utilizzati per elaborare metodi di lotta delle verminosi. Ma d'altra parte lo studio del complicato meccanismo di sviluppo per il quale molti parassiti devono passare prima di giungere di nuovo alla maturità sessuale hanno dato la possibilità di interrompere il ciclo vitale dell'animale nelle localizzazioni più varie e con ciò di combattere efficacemente la diffusione della malattia. Anche qui ci si è valse con successo di nozioni previamente acquisite in altro campo, ad es. nella lotta contro la malaria, nella quale si tratta di interrompere in qualche punto il ciclo che il parassita deve compiere in vari organismi.

Nel dettaglio però, le vie che le indagini di Laboratorio devono seguire devono essere del tutto differenti, secondo il tipo delle varie verminosi, e adattarsi al ciclo di sviluppo. Nelle righe che seguono ciò sarà illustrato in base a tre esempi tipici, delucidando in particolare le singole possibilità per la lotta praticamente efficace contro le verminosi.

Cominciamo con una malattia da trematodi che ha acquistato

in questi ultimi anni una grande importanza proprio alle nostre latitudini nell'allevamento del bestiame, voglio dire la distomatosi epatica, provocata da un trematode (*Fasciola hepatica*), che si annida soprattutto nei dutti biliari dei nostri animali da pascolo, soprattutto nelle pecore e nei bovini. Già per il solo fattore meccanico connesso alla sua presenza, essa provoca gravi alterazioni degenerative alle pareti delle vie biliari e successivamente anche del tessuto epatico attorniante, sicchè gli animali colpiti muoiono con fenomeni che essenzialmente sono quelli della cirrosi e dell'atrofia epatica. Ma anche quando le alterazioni non sono di così alto grado da provocare la morte, il patrimonio zootecnico va soggetto ad una notevole perdita perchè, quando la bestia è abbattuta, gli organi o le parti di organi colpiti dalla fasciola devono essere distrutti perchè inadatti al consumo. Le fasciole sessualmente mature generano nel fegato una grande quantità di uova, che con la bile giungono nell'intestino e da qui sono di nuovo disseminate nei pascoli. Dalle uova emesse si sviluppano, specialmente nelle piccole raccolte di acqua e su terreno umido, le larve cigliate (*miracidî*), che a loro volta non possono penetrare nell'animale da pascolo recettivo, ma devono passare per un ospite intermedio, più precisamente una lumaca nana dei pantani.

Senza questo ospite intermedio, la lumaca, la larva uscita dall'uovo non è infettante per l'animale recettivo. Le cose procedono dunque in modo del tutto simile che nella malaria, nella quale è necessaria un'alternanza di ospite, uomo e zanzara, per la ulteriore diffusione della malattia. Come nella zanzara il parassita della malaria, così qui la *Fasciola* compie nella lumaca un ciclo di sviluppo che dà luogo ad una moltiplicazione molto grande, qui tuttavia per moltiplicazione asessuata dei parassiti. Da una larva cigliata penetrata nel corpo della lumaca si sviluppa un gran numero di larve caudate (*cercarie*) che escono dal corpo della lumaca, si incapsulano nei prati vicini, finchè sono ingoiate dagli animali da pascolo. Allora soltanto sono in

grado di penetrare nell'organismo dell'ospite, di svilupparsi nei dotti biliari nelle forme su descritte, con che il ciclo è chiuso.

Dopo che questo ciclo di sviluppo fu noto nelle sue particolarità (*R. Leuckart, A. P. Thomas*), si ebbe anche la possibilità di interrompere questo ciclo in punti differenti. La distruzione della lumaca incriminata (*Galba truncatula*) sia con metodi chimici o con ripulitura dei pantani, drenaggio, insediamento artificiale di vari nemici naturali della lumaca (anitre), fu, in analogia a quanto si fece per la malaria, il primo mezzo di lotta escogitato. Esso apparve tanto più promettente in quanto che si constatò che la *Fasciola hepatica* preferisce da noi in Europa una sola specie di lumaca. Finora non si è riusciti ad infettare con la larva cigliata della *Fasciola* altre specie di lumache esistenti nelle nostre latitudini, in modo tale che delle larve infettanti potessero essere prodotte in numero altrettanto grande. Si deve dunque ritenere possibile la diffusione dell'epidemia soltanto dove esiste questa specie di lumaca; se essa non c'è, anche la importazione di animali infetti di *Fasciola* non può provocare un'esplosione locale della malattia. Tuttavia in varie regioni dell'estero (America, Sud-Africa, Australia, Filippine) dove la *Galba truncatula* non sembra esistere, altre specie strettamente affini sono entrate in funzione nel ciclo di sviluppo della *Fasciola*. Non invece in Europa, come hanno sicuramente dimostrato indagini ulteriori.

Recentemente si è cercato con ricerche sistematiche di determinare i territori di diffusione della lumaca della *Fasciola* e di concentrare in queste regioni le misure difensive. Ma risultò in primo luogo la necessità di trovare sostanze chimiche adatte per ottenere la distruzione rapida delle lumache, senza in pari tempo danneggiare gli animali erbivori. Queste ricerche hanno indotto ad usare il solfato di rame a diluizioni elevate.

Per la seconda misura di lotta, rivolta alle forme permanenti aderenti alle erbe e capaci d'invasione (cisti), è naturalmente difficile di trovare preparati che attraversino il rivestimento

della cisti che è abbastanza spesso, senza in pari tempo diminuire essenzialmente lo sviluppo dei vegetali o il valore alimentare del fieno così trattato.

Ma oggi appare ancora più promettente di annientare la sorgente della infezione nello stesso animale malato, in questo modo che si cerca di uccidere nelle vie biliari la forma sessuata che produce le uova oppure di costringerla ad abbandonare le vie biliari e con ciò rendere impossibile la ulteriore produzione di uova. La prova di medicamenti che si prestino in particolare a tale scopo viene facilitata dal fatto, che si riuscì ad infettare artificialmente alcuni dei nostri animali da esperimento erbivori (cavie e conigli) e che l'effetto di sostanze chimiche può essere valutato in base ai principî dello studio chemioterapico in serie.

Il tipo speciale di questo ciclo di un trematode che ci rende possibile di intervenire contemporaneamente in vari posti ledibili, ci dà anche la possibilità di ottenere, mediante la combinazione dei vari metodi di lotta, una sommazione di effetti; come nella malaria si cerca analogamente di ottenere la guarigione dei malati e contemporaneamente la distruzione dei trasmettitori.

Ancora più complicato è allo stato attuale delle cognizioni il ciclo di sviluppo di un altro gruppo di vermi (cestodi), la tenia larga dell'uomo (*Diphyllobothrium latum* o *Dibothriocephalus latus*). Per esso sono necessari non un ospite intermedio, ma due diversi ospiti intermedi, onde l'uovo emesso dal parassita sessualmente maturo possa di nuovo raggiungere la forma capace di invasione nel mammifero recettivo.

Il dibotriocefalo dell'uomo emette continuamente uova nell'intestino del soggetto infetto, uova che con le feci e le acque inquinate possono giungere in acquitrini. In un modo del tutto analogo alla *Fasciola*, da queste uova si sviluppa una larva cigliata (oncosfera), che guazza nell'acqua e quindi compie il suo primo ciclo di sviluppo in certe piccole pulci acquatiche (*Cyclops* - *Copepodi*).

I pesci (lucci, perche, capitoni) che ingeriscono cogli alimenti questi piccoli animali, si infettano e divengono il secondo ospite intermedio o trasportatore (*Fülleborn*). Negli organi e nella carne muscolare dei pesci si sviluppano dei piccoli vermiciattoli, che a loro volta non possono svilupparsi ulteriormente in tenia sessualmente matura finchè non giungono nell'intestino di un animale ricettivo. Degli uomini che mangiano crudi o mal cotti tali pesci infetti (insalata di pesce, mayonnaise di pesce, uova di lucci e simili), o degli animali che mangiano gli escrementi di tali pesci infetti si infettano, e nel loro intestino il piccolo vermiciattolo si sviluppa in una tenia sessualmente matura, talora lunga alcuni metri.

Questo ciclo di sviluppo di un cestode dimostra già che si tratta di una malattia legata a determinate località, e soprattutto una malattia dei pescatori; la si osserva infatti sul Lago di Ginevra, su quello di Costanza, nella baia di Curlandia, nel delta del Memel.

Le gravi offese cui vanno soggetti il ricambio e la emopoiesi nei pazienti che albergano il verme, fanno apparire particolarmente necessario di istituire una lotta efficace contro di esso. Riusciti a riprodurre anche in Laboratorio il ciclo di sviluppo nelle sue varie fasi, si è anche in grado di infettare quando si voglia degli animali da esperimento con pesci infettanti, e di procurarsi così un « modello » di esperimento per ricerche chemioterapiche in serie. La lotta consisterà principalmente nella cura dei malati onde fermare in tal modo le fonti di infezione ed evitare che il ciclo di sviluppo riprenda sempre di nuovo. Ma tali provvedimenti sono destinati a fallire se contemporaneamente non viene evitato l'inquinamento delle acque da parte di animali domestici affetti dalla verminosì, e ciò si otterrà eliminando i gatti e i cani malati o curandoli con rimedi ad effetto specifico.

Quale esempio di una infezione da nematodi ricordo la infezione da ascaridi dell'uomo. Anche qui il ciclo di infezione

non è affatto così semplice come prima si riteneva. Manca bensì l'ospite intermedio, ma l'organismo dell'animale ospitante è allo stesso tempo ospite e ospite intermedio (*Fülleborn*). Le femmine sessualmente mature viventi nell'intestino del soggetto infettato producono uova in massa, che giungono all'esterno colle feci e quivi compiono un processo di maturazione. Se per inquinamento di alimenti o per mezzo di sabbia, di oggetti da giuoco, giungono nella bocca di soggetti infettabili, specialmente di bambini, le larve che si schiudono da esse nell'intestino, giungono per il sistema venoso dapprima nel fegato, poi nel cuore destro e da qui nei polmoni; quindi penetrano attivamente forando i capillari negli alveoli, vengono spinte in alto in laringe dall'epitelio vibratile dei bronchi e della trachea, e poi deglutite sicchè giungono di nuovo nello stomaco. Ora esse posseggono le facoltà di insediarsi nel tenue, di svilupparsi in vermi sessualmente maturi e dopo avvenuto l'accoppiamento di riprendere con una nuova produzione di uova il ciclo di sviluppo.

Siccome gli sforzi per distruggere completamente le uova giunte all'esterno e assai resistenti non hanno dato finora risultati pienamente soddisfacenti - e neppure si tratta di provvedimenti di facile esecuzione - apparve particolarmente importante di combattere la infezione nell'organismo stesso dell'ospite.

Le nozioni di biologia offrono possibilità di tentare per via sperimentale la soluzione di questo problema.

Si può trasmettere l'ascaride dell'uomo a tutti i possibili animali da esperimento somministrando per os uova mature oppure introducendo le larve per via cutanea; indi si può seguire il loro ciclo fino all'annidamento nei polmoni.

Ma la infezione sperimentale da ascaridi era anche per altro verso interessante, in quanto che ci metteva in grado di studiare anche le misure difensive che l'organismo oppone alla infezione - e di infezione si tratta veramente - da larve migranti. Ricerche sistematiche fatte in questa direzione ci hanno dimostrato che l'organismo infettato di larve del verme rea-

gisce nello stesso modo che di fronte a germi morbosì batterici, ossia mobilizzando le sue forze difensive. Se cioè si infetta ripetutamente un animale da esperimento colle stesse larve di verme e dopo questo trattamento preliminare si produce una nuova infezione, si può osservare che questa ultima infezione decorre in modo molto più blando di quella antecedente preparatoria, talvolta anzi non attecchisce. Lo stesso effetto si può ottenere mediante previo trattamento con sostanza corporea uccisa di vermi sessualmente maturi, dal che risulta che questo processo di immunità ha molti punti di contatto coi metodi analoghi di immunizzazione con batteri patogeni uccisi.

Attualmente non si può prevedere quale importanza possano acquistare le reazioni cutanee basate del pari su reazioni immunitarie. Qualche dato si ha in campi diversissimi, in particolare nella già citata infezione da trematodi. I progressi ulteriori sono legati a ciò: se si riuscirà ad ottenere antigeni in una forma più pura e quindi più specifica di quanto sia per ora possibile.

Le indagini sierologiche offrono qui dunque nuovi problemi ai Laboratori Chimici, problemi la cui soluzione dà a sperare si possano ottenere dei risultati concreti nella diagnostica delle invasioni verminose, simili a quelli che con la collaborazione di biologi e chimici si sono già ottenuti nella lotta contro le malattie verminose e nella cura delle stesse.

